

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Centro de Investigación Príncipe Felipe

Doctorado en Neurociencias



Papel de la inflamación periférica y la
neuroinflamación en el deterioro cognitivo y motor
en ratas con diferentes grados de daño hepático.
Efectos del tratamiento con rifaximina

Tesis doctoral

Autora: Paola Leone

Directores:

Vicente Felipo

Marta Llansola

Enric Esplugues

Tutor académico:

Vicent Teruel

Julio de 2020

SUMMARY

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Patients with liver cirrhosis may show minimal hepatic encephalopathy (MHE), with mild cognitive impairment, psychomotor slowing and deficits in attention and motor coordination. MHE reduces the ability to perform daily tasks, quality of life and life span and increases accidents, falls and hospitalizations. MHE is a serious health, social and economic problem (Bajaj et al., 2009; Felipo, 2013). The mechanisms by which liver disease leads to MHE are beginning to be clarified in studies in patients and in animal models.

Cognitive and motor alterations are prevented or reversed in animal models of hyperammonemia and MHE by treatments that reduce peripheral inflammation such as anti-TNF- α or ibuprofen (Cauli et al., 2009c; Cauli et al., 2007b; Dadsetan et al., 2016a; Dadsetan et al., 2016b; Rodrigo et al., 2010), by treatments that reduce microglia activation and neuroinflammation such as inhibitors of p38 MAP-kinase, sulforaphane, inhibitors of phosphodiesterase 5 or extracellular cGMP or by treatments that reduce GABAergic neurotransmission (Agusti et al., 2011; Agusti et al 2017; Cabrera-Pastor et al., 2018; Hernandez-Rabaza et al., 2016b). The above reports support that liver failure lead to peripheral inflammation, which induces neuroinflammation, which, in turn alters neurotransmission resulting in impaired cognitive and motor function (reviewed in Cabrera-Pastor et al., 2019).

Some reports in the literature suggest that a similar process would occur in patients with chronic liver diseases. Mangas-Losada et al (2017b) proposed that the appearance of MHE in patients with liver cirrhosis is associated to a shift in the type of peripheral inflammation, resulting in increased activation of CD4⁺ T-lymphocytes, increased differentiation of CD4⁺ T lymphocytes to Th follicular and Th22, increased amount of CD4⁺CD28⁻ T lymphocytes, associated with increased levels of IL-17, CCL20, CX3CL1 (fractalkine) and of IL-15. Mangas-Losada et al (2017b), proposed that this shift in peripheral inflammation would promote the infiltration of lymphocytes into the brain, which is promoted by CCL20, CX3CL1 (fractalkine) and of IL-15 (Broux et al., 2012b; Broux et al., 2015). This would induce neuroinflammation which, in turn, would lead to the cognitive and motor alterations in patients with MHE.

Balzano et al (2018) analyzed in detail the presence of neuroinflammation in cerebellum of patients who died with different grades of chronic liver disease, from mild steatohepatitis to cirrhosis. They found that patients with mild steatohepatitis already show infiltration of T lymphocytes in the meningeal space of cerebellum, which is associated with neuroinflammation, activation of microglia and astrocytes and loss of Purkinje and granular neurons. This supports the idea proposed by Mangas-Losada et al (2017b) that a shift in peripheral inflammation leading to infiltration of lymphocytes into the brain would trigger neuroinflammation and MHE in cirrhotic patients. Moreover, the report from Balzano et al (2018) shows that this process may already occur in patients with mild steatohepatitis, before reaching cirrhosis. This is also in agreement with a previous report from Felipe et al (2012b) showing that patients with steatohepatitis may show mild cognitive and motor impairment before reaching liver cirrhosis if the levels of ammonia and inflammation are high enough.

It is noteworthy that T-lymphocytes infiltration, neuroinflammation and neuronal loss is remarkable in cerebellum (Balzano et al., 2018) which seems to be one of the brain areas which function is altered at early phases of MHE (Felipe et al., 2014). This is reflected in early alterations of motor coordination, a function modulated mainly by cerebellum (Giménez-Garzó et al., 2017; Butz et al., 2010). Motor incoordination is due, at least in part, to an increase in extracellular GABA in cerebellum and to the activation of its GABA_A receptors. Previous studies in animal models of MHE show that the increase in extracellular GABA is produced by alteration in membrane expression and reversal of function of GABA transporters and that these alterations are induced by neuroinflammation (Hernández-Rabaza et al., 2016b; Dadsetan et al., 2016a; Cabrera-Pastor et al., 2018).

Spatial learning and memory are largely modulated by hippocampus (O'Keefe and Nadel, 1978; Morris et al., 1982). Hippocampus is involved in recognition memory associated with spatial information processing (Mumby et al., 2002; Barker and Warburton, 2011) and other cognitive processes such as object recognition memory (Broadbent et al., 2004; Hammond et al., 2004; Hammond et al., 2004) and working memory (Siapas et al., 2005; Hyman et al., 2010; Yoon et al., 2015). In rats with liver failure or hyperammonemia, spatial learning and memory impairment is associated with altered membrane expression in hippocampus of AMPA, NMDA and GABA_A receptors induced by neuroinflammation (Hernández-Rabaza et al., 2015, 2016a; Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-González et al., 2019).

Altogether the above reports suggest that changes in the immune system and infiltration of T-lymphocytes into the brain associated to appearance of mild cognitive and motor impairment may occur already at early phases of steatohepatitis. If this is the case, treatments to prevent or reverse this process and MHE should be used already in patients with steatohepatitis, before reaching liver cirrhosis.

It has been shown that treatment with rifaximin, a non-permeable antibiotic, improves cognitive and motor function in a relevant proportion of cirrhotic patients with MHE (Bajaj et al., 2011; Mangas-Losada et al., 2019; Sharma et al., 2013). Improvement of cognitive and motor function in patients with MHE is associated with normalization of the blood levels of IL-17, CCL20, CX3CL1 (fractalkine) and of IL-15 (Mangas-Losada et al., 2019), that promote the infiltration of lymphocytes into the brain. This, together with the above reports, suggests that rifaximin could be improving MHE by reducing the infiltration of T lymphocytes into the brain. This can't be assessed in patients, but may be studied in animal models.

The objectives of this thesis are, in rats with different grades of liver failure: 1) to characterize cognitive and motor alterations; 2) to characterize neuroinflammation in hippocampus and cerebellum and to assess whether rifaximin treatment prevents it; 3) to analyze the mechanisms involved in neurotransmission alterations: role of changes in membrane expression of glutamate and GABA receptors and transporters in hippocampus and cerebellum and in extracellular levels of glutamate and GABA in cerebellum; 4) to evaluate whether rifaximin treatment prevents alterations in membrane expression of AMPA and/or NMDA receptors in hippocampus and the impairment of spatial and recognition memory; 5) to assess whether treatment with rifaximin prevents alterations in GABAergic neurotransmission in cerebellum and in mechanisms that modulate it, as well as learning impairment in the Y-maze and motor incoordination; 6) to characterize peripheral inflammation, immunophenotype and infiltration of immune system cells into the brain; 7) to analyze whether treatment with rifaximin prevents or reverses peripheral inflammation, changes in immunophenotype and immune system cells infiltration into the brain.

As a rat model of chronic liver disease progressing from steatosis to different grades of steatohepatitis and liver cirrhosis, we used rats injected with CCl₄.

We analyzed changes in peripheral inflammation, T lymphocytes infiltration into cerebellum and hippocampus, neuroinflammation, alterations in neurotransmission and

motor coordination and cognitive impairment. We also assessed if chronic treatment with rifaximin improves the changes induced by liver fail on the above parameters.

METHODS

Male Wistar rats (150-180 g) were intraperitoneally injected (1 mL/kg) 3 times/week with 10% CCl₄ dissolved in corn oil during two, four, eight or twelve weeks to induce different grades of hepatic failure. Control rats were injected with corn oil. Rats were distributed into four groups: control; control+rifaximin; CCl₄ and CCl₄+rifaximin. Rifaximin (Sigma) was dissolved in 100% ethanol and orally administered (20mg/kg) once daily until sacrifice, from week two after first CCl₄ injection.

The experiments were approved by the Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) of our Center and by Conselleria de Agricultura of Generalitat Valenciana and performed according to the European Commission Directive (2010/63/EU) for care and management of experimental animals and comply with the ARRIVE guidelines for animal research.

The grade of liver damage was analyzed using Hematoxylin and Eosin (H&E) and Masson trichrome stains of PFA-fixed paraffin-embedded liver. Steatohepatitis was graded using a scoring system as in Kleiner et al (2005).

Plasma was obtained in EDTA-containing vials and stored at -80 °C. TNF-α in plasma was measured using an ELISA Kit from eBioscience. All other cytokines in plasma were analyzed by western blot. Ammonium levels in plasma were measured using a Kit from PocketChemBA system.

Motor coordination was assessed by Rotarod and Beam Walking tests. Learning of a conditional discrimination task was assessed by Y-maze. Spatial learning and memory was assessed by radial maze and novel object location test. Recognition memory of a new object was assessed by novel object recognition test.

Extracellular basal concentration of GABA and glutamate was measured by HPLC-MS in samples collected by microdialysis in cerebellum *in-vivo*. Membrane surface expression of GABA and glutamate subunits of receptors and transporters was analyzed as in Cabrera-Pastor et al (2018).

Neuroinflammation was analyzed by immunohistochemistry and western blot, and neuronal loss by H&E stain. Lymphocytes infiltration in brain was analyzed by immunohistochemistry.

Lymphocyte population in whole blood were characterized by flow cytometry.

RESULTS

We assessed the progression of liver damage and classified rats as mild steatohepatitis after 2 weeks of CCl₄ injection, steatohepatitis after 4 weeks, advanced steatohepatitis after 8 weeks and cirrhosis after 12 weeks.

1. Cognitive and motor impairment in rats with different grades of hepatic failure. Underlying mechanisms. Effects of rifaximin

1.1 Impaired motor coordination. Alterations in cerebellum

Rats with steatohepatitis (4 weeks of CCl₄ injection) show motor incoordination. We have verified that extracellular glutamate and GABA are increased in the cerebellum of these rats. We also observed a decreased membrane expression of the glutamate transporter GLAST and of the GABA transporter GAT-1 and an increase in the GABA transporter GAT-3.

Among the GABA transporters, GAT-1 is expressed mainly in neurons and specifically in the presynaptic endings of axons, while GAT-3 is mainly localized in perisynaptic astrocytes (Zafar and Ishrat, 2018). In activated astrocytes, in pathological situations, with neuroinflammation, GAT3 changes its function and instead of re-uptaking GABA, it releases GABA to the extracellular environment, also contributing to the increase in extracellular GABA (Hernández-Rabaza et al., 2016a; Agusti et al., 2017). The increase in extracellular GABA, therefore, would be due to the reversal of GAT-3 function in activated astrocytes and to the reduction of the membrane expression of the GAT-1 transporter in neurons. Cabrera-Pastor et al. (2018) showed that in rats with chronic hyperammonemia, the reversal of GAT-3 function is due to a higher expression of NF- κ B in activated microglia, as a consequence of the activation of the TNFR1 receptor by TNF α , which is increased. The transcription factor NF- κ B activates glutaminase transcription, which in turn increases extracellular glutamate levels and leads to increased transport of glutamate and sodium by activated astrocytes via GLT1 and GLAST transporters. Increased intracellular sodium reduces the sodium gradient and leads to reversal of GAT-3 function and release of GABA.

In cerebellum, the alteration of GABAergic and glutamatergic neurotransmission is a consequence of neuroinflammation. In rats with steatohepatitis, microglia and astrocytes are activated. There is an increase in TNF α in the cerebellum that must be responsible for activating TNFR1 and increasing NF- κ B in microglia, which finally leads to an increase in extracellular GABA, producing motor incoordination.

Treatment with rifaximin prevents astrocytes activation and reverses microglia activation, as well as the increase in TNF α . Thus, by preventing neuroinflammation, rifaximin normalizes extracellular glutamate levels and GABA transporters membrane expression and extracellular GABA levels. This leads to the restoration of motor coordination in rats with steatohepatitis.

In cerebellum of rats with hyperammonemia or with porta-caval anastomosis (PCS), the increase in GABAergic tone, induced by neuroinflammation, contributes to the decrease in the function of the glutamate-NO-cGMP pathway, and to the subsequent impairment of learning of a conditioned discrimination task in the Y-maze (Cauli et al, 2007b; Cabrera-Pastor et al., 2016b; Agusti et al., 2011; Dadsetan et al. 2016a; Hernández-Rabaza et al, 2016a 2016b). Our group has shown that by reducing the activation of GABA_A receptors with bicuculin, pregnenolone sulfate or GR3027, GABAergic tone is reduced, with the consequent restoration of the function of the glutamate-NO-cGMP pathway and of the ability to learn a conditioned discrimination task in the Y-maze (Cauli et al., 2009a; Gonzalez-Usano et al., 2014; Johansson et al., 2015).

In rats with steatohepatitis, learning of a conditioned discrimination task in the Y-maze is also impaired, and the increase in extracellular GABA in the cerebellum would be responsible for this cognitive alteration. Rifaximin improves learning ability in the Y-maze, and this would be a consequence of the normalization of GABAergic tone in cerebellum of rats with steatohepatitis.

Rats with steatohepatitis show neuronal loss in Purkinje and granular layers. Balzano et al. (2018) showed that patients died with steatohepatitis present degeneration of both Purkinje and granular neurons in cerebellum. This neurodegeneration was associated with neuroinflammation and infiltration of immune system cells. They suggest that the neuronal loss in these patients would be consequence of microglia activation, which normally phagocytoses dead or degenerating neurons, but can also phagocytose living neurons through a process called "phagoptosis".

By normalizing glial cell activation and TNF α levels, rifaximin prevents neuronal loss in Purkinje layer and stops it completely in granular layer in the stage of steatohepatitis.

Rats with cirrhosis (12 weeks of CCl₄ injection) keep showing motor incoordination in the beam walking test, but not in the rotarod. In cerebellum of these rats GAT1 membrane expression is still decreased, whereas GAT3 membrane expression is no longer increased. This suggests that the decrease in GAT-1 membrane expression should be sufficient to

induce an increase in GABAergic tone and motor incoordination in the beam walking test but not in the rotarod test. Another possibility is that the greater weight and size of rats in this situation makes the permanence in the rotarod shorter than in control rats, and this means that alterations in motor coordination are no longer observed in rats with liver cirrhosis. Although these rats keep presenting glial cell activation and increased TNF α in cerebellum, responsible for alterations in neurotransmission and therefore motor incoordination, we no longer observed the increase in GAT3. In cirrhosis stage, neuronal loss is maintained in granular layer and increases slightly in the Purkinje layer.

In rats with cirrhosis, rifaximin is no longer able to prevent TNF α increase, although it does prevent the activation of astrocytes and reduces that of microglia. Despite this, treatment with rifaximin restores motor coordination normalizing alterations in GAT-1 membrane expression. These data suggest that in the cirrhosis stage, rifaximin should reverse GAT-1 membrane expression and motor incoordination by acting in other steps of the pathway, after the increase in TNF α , or by other independent mechanisms.

1.2 Cognitive impairment. Alterations in hippocampus

Rats with steatohepatitis (4 weeks of CCl₄ injection) show spatial memory impairment in the novel object location test and reduced learning index in the radial maze, with a slight increase in the number of reference errors compared to the control rats, while working memory and recognition memory of a new object are not affected. Rats with steatohepatitis show an increase in membrane expression of GluA2 subunit of AMPA receptors and a decrease in membrane expression of NR1 and NR2A subunits of NMDA receptors in hippocampus. Long-term potentiation (LTP) is essential for spatial learning and memory, and is modulated by AMPA and NMDA receptors (Morris and Frey, 1997). LTP is altered in PCS rats (Monfort et al., 2007). In rats with steatohepatitis, the alteration of the AMPA and NMDA receptor subunits membrane expression would induce LTP impairment, which would impair spatial learning and memory. Activation of the AMPA receptors leads to the entry into the postsynaptic neuron of Na⁺ and Ca²⁺. Ca²⁺ entry does not occur in receptors containing the GluA2 subunit (Geiger et al., 1995). Therefore, the increase in its membrane expression would lead to the alteration of intracellular signaling, which would contribute to the impairment of spatial learning and memory in rats with steatohepatitis. These results are similar to those reported in PCS rats, which also show an increase in the hippocampal membrane expression of GluA2 and a decrease in NR1 and NR2A, which are associated with impaired spatial learning and memory in the Morris

water maze (Hernández-Rabaza et al., 2015). Since alterations in glutamatergic neurotransmission in the hippocampus are established as a consequence of neuroinflammation, we analyzed whether in rats with steatohepatitis, neuroinflammation is already observed in hippocampus. In hippocampus of rats with steatohepatitis, activation of microglia and astrocytes and increased levels of TNF α and IL-1 β are observed. It has been shown in hyperammonemic rats that the increase in TNF α and IL-1 β (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Hernández-Rabaza et al., 2016a), contributes to a decrease in the learning index in the radial maze. There is evidence that certain cytokines are involved in some cognitive disorders but not in others. In hyperammonemic rats, the increase in TNF α induces alterations in spatial learning and reference memory, while the increase in IL-1 β alters working memory (Cabrera-Pastor et al., 2016a). Therefore, the increase in TNF α in hippocampus in rats with steatohepatitis would contribute to the decrease in learning index. However, the increase in IL-1 β is not sufficient to alter working memory in rats with steatohepatitis. Taoro-González et al. (2019) have shown that IL-1 β is involved in neuroinflammation-induced non-spatial memory impairment, while spatial recognition memory impairment is independent of IL-1 β and is mediated by other pro-inflammatory factors. In our case, the increase in IL-1 β in hippocampus is not sufficient to alter the recognition memory of a new object, non-spatial, in rats with steatohepatitis, suggesting that more factors are necessary, in addition to the increase in IL-1 β , or a greater increase in IL-1 β .

In rats with steatohepatitis, treatment with rifaximin does not normalize GluA2 membrane expression, but prevents the decrease of NR1 and NR2A membrane expression. NMDA receptors are involved in modulation of spatial learning and memory. These data indicate that rifaximin could be preventing spatial learning and memory impairment through modulation of glutamatergic neurotransmission, in particular through normalization of membrane expression of the NR1 and NR2A subunits of the NMDA receptor, which seem to play a more important role than GluA2 under these conditions.

In rats with steatohepatitis, rifaximin prevents the activation of microglia but not that of astrocytes, and reduces TNF α but not IL-1 β levels. The decrease in TNF α would be sufficient to prevent impairment of new location recognition memory and of learning index in the radial maze, supporting the fact that IL-1 β does not have an important role in the modulation of spatial memory and learning. Our results support that the mechanisms involved in the impairment of spatial learning and memory are modulated

by $\text{TNF}\alpha$ released by microglia, and by its modulation of glutamatergic neurotransmission through NMDA receptors.

Rats with advanced steatohepatitis (8 weeks of CCl_4 injection) continue to show decreased learning ability and impaired recognition memory of a new location, but also show impairment of working and reference memory in the radial maze. In hippocampus of these rats, the membrane expression of the GluA2 subunit of AMPA receptors is normalized, while that of the GluA1 subunit increases. With respect to NMDA receptors, the membrane expression of NR2A continues to decrease, but that of NR1 no longer. Furthermore, the membrane expression of the alpha 1 and alpha 5 subunits of the GABA_A receptors, which is not altered in steatohepatitis, is decreased. GluA1 subunit is essential for spatial learning (Sanderson et al., 2008). In rats with chronic hyperammonemia, alterations in working memory and reference memory are associated with an increase in hippocampal membrane expression of GluA1 (Cabrera-Pastor et al., 2016a) and a decrease in $\text{GABA}_A\alpha 1$ and NR2A (Taoro-Gonzalez et al., 2019). Our results suggest that an increase in GluA1 and a decrease in $\text{GABA}_A\alpha 1$, which were not altered in steatohepatitis, as well as working memory, would contribute to altered working memory in rats with advanced steatohepatitis. The decrease in NR2A must contribute to the impairment of spatial learning in the radial maze in rats with steatohepatitis of different grades.

In the stage of advanced steatohepatitis, the activation of microglia and astrocytes and the increase in $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ persist, which cause alterations in the membrane expression of glutamate and GABA receptors, implicated in the impairment of reference and working memory in the radial maze.

In rats with advanced steatohepatitis, rifaximin continues to prevent the increase in $\text{TNF}\alpha$ and the decrease in NR2A membrane expression, preventing the impairment of recognition memory of a new location and of spatial learning in the radial maze. Furthermore, at this stage, rifaximin reverses the activation of astrocytes, the increase in $\text{IL-1}\beta$ and the decrease in $\text{GABA}_A\alpha 1$ membrane expression, thus preventing the impairment of working memory in the radial maze and suggesting that the $\text{GABA}_A\alpha 1$ receptor plays a more relevant role in the modulation of working memory than the increase in GluA1, which is still altered in rats treated with rifaximin.

New object recognition memory, which is not altered in steatohepatitis, is affected in cirrhotic rats (12 weeks of CCl_4 injection), which also keep showing impaired recognition

memory of a new location. In hippocampus of these rats, the membrane expression of GluA1 continues to increase, and that of GluA2 also increases again. The membrane expression of NR2A is normalized, while that of NR1 is again decreased. The membrane expression of GABA α 5 continues to be decreased, and that of GABA α 1 is increased. In PCS rats, the increase in GABA α 1 membrane expression in hippocampus is also associated with altered spatial learning and memory (Hernández-Rabaza et al., 2015). Our data suggest that the increase of GABA α 1 in the membrane may be related to the alteration of recognition memory of a new object, since it is the only element that only occurs in cirrhotic rats and not in rats with a lower degree of liver damage. In the cirrhosis stage, the activation of microglia and astrocytes and the increase in TNF α and IL-1 β persist, which must participate in the alteration of GABA and glutamate receptor subunits membrane expression.

In cirrhotic rats, treatment with rifaximin does not reverse the decrease in membrane expression of NR1 and GABA α 5, or the increase in GABA α 1 and GluA1, although it does reverse the increase in GluA2, which must be involved and be sufficient to prevent the impairment of recognition memory of a new location. The increase in TNF α and the activation of microglia are also not totally prevented by rifaximin in cirrhotic rats, but the increase in IL-1 β and the activation of astrocytes are prevented, which corroborates the role of IL-1 β in the impairment of recognition memory of a new object.

2. Role of peripheral inflammation in the induction of neuroinflammation

Once we have verified and characterized cognitive and motor alterations in rats with different grades of liver damage, as well as the associated alterations in glutamatergic and GABAergic neurotransmission, in hippocampus and cerebellum, and we have characterized the neuroinflammation in these two brain areas, the next objective of this work was to determine how neuroinflammation is induced in different grades of liver damage.

Based on the fact that both hyperammonemia and peripheral inflammation contribute to the development of neuroinflammation, hyperammonemia in blood was analyzed. Hyperammonemia per se has been shown to induce peripheral inflammation (Balzano et al., 2020). Rats show hyperammonemia from the sixth week of CCl $_4$ injection, indicating that neuroinflammation precedes the onset of hyperammonemia. Therefore, we analyzed peripheral inflammation, which would be the main inducer of neuroinflammation in rats with steatohepatitis. The appearance of hyperammonemia from the sixth week of CCl $_4$

(intermediate steatohepatitis) could contribute to the evolution of the effects observed in cerebellum and hippocampus. It is well established that chronic hyperammonemia per se is sufficient to induce neuroinflammation and neurological impairment (Rodrigo et al., 2010; Hernández-Rabaza et al., 2016a).

2.1 Changes in peripheral cytokines associated to liver damage

During the first two weeks of liver failure, rats with mild steatohepatitis show an increase in pro-inflammatory cytokines IFN γ , TNF α , IL-6 and IL-15 (early acute phase) and later also an increase in IL-17 (late acute phase). These changes are consistent with those observed in patients with steatohepatitis (Tilg and Diehl, 2000). At 4 weeks, TNF α levels are still increased, but an increase in the anti-inflammatory cytokines IL-4 and TGF β and a decrease in IL-10 are also observed. All these factors are involved in mechanisms aimed to suppressing the synthesis of pro-inflammatory and fibrogenic cytokines (Tilg and Diehl, 2000). At 8 weeks, IL-15 levels continue to increase, and at 12 weeks the increase in IFN γ , TNF α , IL-17 and TGF β and the decrease in IL-10 are still observed. These fluctuations in plasma cytokine levels could be due to an adaptive process, by which the body adapts to inflammation at week 4, but as liver damage progresses, the pro-inflammatory response again surpasses the anti-inflammatory response. Another factor that can contribute to changes in cytokines is the onset of hyperammonemia after 6 weeks. Along with pro- or anti-inflammatory cytokines, other types of cytokines whose function is to attract different types of immune system cells are also expressed; these are chemokines or chemoattractant molecules. Liver damage induces a rapid increase at two weeks of the chemokines CCL20 and CX3CL1, which also increase in cirrhotic patients with MHE. However, in rats injected with CCl $_4$ the levels of these chemokines evolve over time, as do the other cytokines. In fact, at 4 weeks CCL20 is not increased, but increases again in rats with advanced steatohepatitis and remains increased in cirrhotic rats, while CX3CL1 is no longer increased in rats with advanced or cirrhotic steatohepatitis. Thus, the increase in CCL20 reproduces what occurs in cirrhotic patients with MHE, while in rats with cirrhosis induced by chronic injection of CCl $_4$ some different mechanism prevents CX3CL1 from remaining increased, unlike in cirrhotic patients with MHE.

After only one week of treatment with rifaximin, it is able to prevent the increase in TNF α and IL-15, but not that of IL-17, indicating that it prevents some changes in peripheral inflammation but not others. Two weeks of treatment with rifaximin prevents the increase

in IL-4 and also reduces the increase in TNF α but does not affect the decrease in IL-10, again suggesting that the effects of rifaximin are specific on some cytokines, it is not a general effect on peripheral inflammation induced by liver damage. However, a longer treatment with rifaximin no longer prevents the increase in IL-15 or TNF α in cirrhotic rats, which would explain that some brain alterations are not prevented by rifaximin in rats with liver cirrhosis. This may be because there is an adaptation to the effects of rifaximin or because liver damage is more important and this dose of rifaximin is no longer sufficient to counteract the increase in some pro-inflammatory cytokines.

2.2 Alterations in immunophenotype associated to liver damage

Changes in cytokine levels are associated with changes in immunophenotype. Rats with mild steatohepatitis (2 weeks of CCl₄) present in peripheral blood decreased CD4⁺ T lymphocytes and B lymphocytes, and increased CD8⁺ T lymphocytes. These rats also show a decrease in both CD4⁺ and CD8⁺ memory cells.

Lymphocyte migration to the intestine under homeostasis conditions has been described (Cahill et al., 1977; McDermott and Bienenstock, 1979; Smith et al., 1970), and the mechanisms underlying this phenomenon have been elucidated since the discovery of adhesion molecules and cytokines involved in the recruitment of these immune cells in the intestine (Streeter et al., 1988; Shaw et al., 1995; Butcher et al., 1999). Some chemokines have also been reported to play an important role in the recruitment and localization of lymphocytes in the intestine (Luster, 2001; Papadakis and Targan, 2000; Yoshie et al., 2001). Cells of the immune system that can migrate to the intestine include T and B lymphocytes, both memory and effectors (Kunkel and Butcher, 2002; Kunkel et al., 2010). In patients with NASH, liver failure and the consequent peripheral inflammation induce permeabilization of the intestinal barrier (Wigg et al., 2001; Luther et al., 2015; Ray, 2015). In addition, the liver is constantly exposed to products of commensal bacteria (physiologically resident in the intestine) with inflammatory potential. Intestinal dysbiosis leads to chronic pathological inflammation of the liver (Robinson et al., 2016) and increased expression of adhesion molecules and chemokines, allowing the attraction of lymphocytes to the liver (Lalor et al., 2002). In other words, liver damage permeabilizes the intestinal barrier and this in turn contributes to increasing liver inflammation. These observations support the hypothesis that the lymphocytic populations that appear decreased in the plasma of rats with mild steatohepatitis could have left the bloodstream to first infiltrate the intestine and secondly the liver. On the

other hand, early lymphopenia has been associated with steatosis (Loof et al, 2018). This lymphopenia could be a consequence of infiltration into the intestine.

Cytotoxic CD8⁺ cells involved in the cellular immune response secrete large amounts of IFN γ and TNF α (Murata et al., 2002), so their increase would be responsible for the initial increase in these pro-inflammatory cytokines in rats injected with CCl₄. CD8⁺ T lymphocyte levels are also increased in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C and this increase is associated with the induction of liver damage (Murata et al., 2002). As liver damage progresses, peripheral levels of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes get normalized, indicating that their alteration is only part of the initial response to liver damage, but later their plasma levels are no longer altered, suggesting that a certain adaptation occurs in the peripheral immune system.

Autoreactive CD4⁺CD28⁻ levels of lymphocytes are subjected to variations as liver damage progresses in rats injected with CCl₄. Loss of the costimulatory molecule CD28 in CD4⁺ lymphocytes is a consequence of persistent immune activation. Prolonged exposure to TNF α reduces the expression of CD28 in T cells by reducing its transcription (Lewis et al., 2004). This suggests that prolonged increase in TNF α contributes to increased levels of CD4⁺CD28⁻ autoreactive lymphocytes. On the other hand, CD8⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells inhibit the proliferation of CD4⁺CD28⁻ cells and the secretion of IFN γ and IL-17 (Correale et al., 2010; Cao et al., 2016). At 2 weeks of liver failure, the amount of CD8⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in the blood is reduced, which contributes to the proliferation and increase of CD4⁺CD28⁻ autoreactive cells, which produce IFN γ and IL-17. At 4 weeks of liver failure, the number of CD8⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells increases and suppresses the proliferation of autoreactive CD4⁺CD28⁻ cells, which return to normal levels at 4 weeks, along with IFN γ and IL-17. After 8 weeks of liver failure, the levels of CD8⁺FoxP3⁺ cells return to normal values, and this allows the autoreactive CD4⁺CD28⁻ cells to proliferate again. After 12 weeks of liver failure, despite the increase in CD8⁺FoxP3⁺ regulatory T cells, CD4⁺CD28⁻ autoreactive cells also continued to increase, with the consequent increase in IFN γ and IL-17. This suggests that the activation of CD4⁺CD28⁻ cells by TNF α persists as liver damage progresses, and that the suppressive action of CD8⁺FoxP3⁺ regulatory cells is insufficient to counteract their proliferation.

In rats with steatohepatitis CD4⁺ regulatory T cells are increased. TGF β is a potent inducer of FoxP3 expression and regulatory T cell function (Chen et al., 2003). Andersson

et al. (2008) have shown that CD4⁺ regulatory T cells induce the differentiation of other CD4⁺ regulatory T cells from *naïve* T precursors, in a TGF-β-dependent manner, thus generating infectious tolerance. In rats with steatohepatitis, TGF-β levels increase, stimulating the differentiation of *naïve* T cells to CD4⁺ regulatory T cells by inducing FoxP3 transcription. At 8 and 12 weeks of liver failure, CD4⁺ regulatory T levels continue to increase, leading to a subsequent production of TGF-β, whose values will be increased again in cirrhotic rats.

CD8⁺CD28⁻ T cell population is increased in rats with advanced steatohepatitis. Alterations in CD8⁺CD28⁻ T cell levels have been described in cancer, viral infections, autoimmunity, and almost all chronic inflammatory diseases (Strioga et al., 2011; Arosa et al., 2017). It is a population of regulatory cells that exerts direct effects on CD4⁺ T cells, inhibiting their activation and proliferation and decreasing the secretion of pro-inflammatory cytokines (Liu et al., 2015; Reiser and Banerjee, 2016). However, in some pathologies, such as chronic obstructive pulmonary disease and rheumatoid arthritis, CD8⁺CD28⁻ T cells express increased levels of cytotoxic mediators, such as perforin and granzyme B, and of pro-inflammatory cytokines, such as IFN-γ and TNFα (Hodge and Hodge, 2016). These autoreactive cells could therefore be responsible for, or at least contribute to, the increase in IFN-γ and TNFα levels in advanced liver disease. In the cirrhosis stage, CD8⁺CD28⁻ autoreactive cells continue to increase, contributing to increased peripheral levels of TNFα and IFN-γ.

In rats with steatohepatitis, memory T cells levels, both CD4⁺ and CD8⁺, appear increased. *Naïve* CD4⁺ or CD8⁺ T cells are activated upon exposure to a certain antigen, and subsequently undergo proliferative expansion and differentiation into effector T cells. These activated effector T cell populations contain antigen-specific long-term memory T cell precursors, which persist *in vivo* as heterogeneous populations at multiple sites, and can coordinate protective immune responses upon re-exposure to the pathogen (Farber et al., 2014). Therefore, the increase in memory T cells indicates an activation of the immune system.

The existence of "multipotent" CD4⁺ memory T cells, capable of producing a wide variety of cytokines, including IFNγ and TNFα, at higher levels than specific cytokine-producing cells, have been described (MacLeod et al., 2009). The increase in CD4⁺ memory T cells after 4 weeks of liver damage induction could therefore contribute to the increase in peripheral levels of TNFα. The production of IL-15 is necessary for the proliferation and

survival of CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells (Kim and Harty, 2014; Raeber et al., 2018). The peripheral increase in this cytokine at 1 and 2 weeks of CCl₄ injection could contribute to the maturation and proliferation of memory T cells, whose values increase at week 4. In rats with advanced steatohepatitis, the levels of memory T cells continue to be increased, and those of IL-15 also increase again, favoring their proliferation and differentiation. In cirrhotic rats memory T cells continue to be increased, and this is associated with the production of TNF α and IFN α . Its proliferation in this stage of liver damage would be favored by the increase in peripheral IL-17 levels.

In rats with steatohepatitis, at week 4, B lymphocytes levels are also increased. TNF α secreted by T cells, in combination with IL-4, has been reported to favor B lymphocytes proliferation (Elgueta et al., 2009). Both cytokines appear increased in these rats, so they could be the inducers of B cell proliferation.

After 8 weeks an increase in the number of activated monocytes is also observed. Chronic liver failure is associated with portal hypertension, and this alteration is reproduced in rats with chronic liver damage induced by CCl₄ (Zhang et al., 2016). Portal hypertension has been shown to induce production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α by activated monocytes in peripheral blood (Pérez del Pulgar et al., 2000; McClain and Cohen, 1989). In patients with alcoholic cirrhosis, peripheral blood monocytes show decreased IL-10 secretion, which could play an important role in monocyte activation and increased TNF α production seen in alcoholic liver disease (as well as hepatic fibrotic response in these patients) (Le Moine et al., 1995).

CX3CL1 is involved in the recruitment of T and B lymphocytes, NK cells, and monocytes (Ferretti et al., 2014). In rats with advanced steatohepatitis, the activation of monocytes would contribute to the increase in TNF α and would be associated with an increase in CX3CL1 levels. Once activated, monocytes proliferate and in cirrhotic rats could contribute to a decrease in IL-10 content and an increase in TNF α .

Treatment with rifaximin prevents many of the alterations in plasma cytokine levels, preventing immune system activation and the consequent increase in memory T lymphocytes.

Rifaximin prevents the increase in CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T lymphocytes and the increase in peripheral TGF β . It also normalizes the levels of TNF α in blood, and this may contribute to the normalization by rifaximin of the levels of CD4⁺CD28⁻ lymphocytes in

rats with liver failure. In rats with steatohepatitis, rifaximin normalizes changes in CD8⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and CD4⁺CD28⁻ autoreactive cells, which may help prevent the increase in TNF α in blood.

However, in rats with cirrhosis, rifaximin is not able to normalize CD4⁺CD28⁻ and CD8⁺FoxP3⁺ lymphocytes levels. Treatment with rifaximin normalizes the levels of CD8⁺CD28⁻ T cells, normalizing the levels of IFN- γ , but has no effect on the levels of TNF α . These data suggest that in cirrhotic rats IFN- γ production would be associated with the expansion of CD8⁺CD28⁻ autoreactive T lymphocytes, while that of TNF α would depend on other additional mechanisms.

Rifaximin reverses the activation of monocytes, which in cirrhotic rats is associated with the normalization of IL-10 levels but not of TNF α , whose increase is due not only to activated monocytes but also to other populations of immune cells, such as memory cells. TNF α can also be produced in tissues and organs.

2.3 Infiltration of peripheral immune system cells into the central nervous system (CNS)

One mechanism through which peripheral inflammation transmits effects to the brain causing neuroinflammation is the infiltration of immune system cells, frequently associated with the alteration of the blood-brain barrier (BBB). Inflammatory stress induced by IL-6, TNF α and/or IL-17 leads to a loss of integrity of the BBB, with a decrease in tight junction proteins such as occludin and ZO-1 (Ni et al., 2017; Voirin et al., 2020). After only one week of CCl₄ administration, a rapid increase in TNF α and IL-6 is observed, followed by an increase in IL-17 at 2 weeks, which would induce the decrease in occludin and ZO-1 observed in the cerebellum, leading to permeabilization of the BBB in rats with mild steatohepatitis, which would facilitate the infiltration of CD4⁺ lymphocytes and monocytes/macrophages observed in rats with steatohepatitis, both in the cerebellum and in the hippocampus.

Prevention by rifaximin of most of the changes in peripheral inflammation would explain why it prevents the reduction of occludin and ZO-1 and the infiltration of CD4⁺ lymphocytes and macrophages in the cerebellum.

However, in hippocampus, rifaximin is only able to prevent macrophage infiltration, but not lymphocyte infiltration. This would be associated with a lower effect of rifaximin on neuroinflammation in the hippocampus compared to the cerebellum. Furthermore, this

suggests that the infiltration and neuroinflammation mechanisms in hippocampus would be different, at least in part, from those that occur in the cerebellum.

The infiltration of monocytes-macrophages and T lymphocytes is promoted by cytokines that act as chemoattractant. CCL2 and CX3CL1 promote the recruitment of peripheral monocytes (D 'Mello et al., 2009; Ní Chasaide et al., 2020; Wolfe et al., 2018; Bajaj et al., 2013) and T lymphocytes (Ní Chasaide et al. , 2020; Cédile et al., 2017; Schulz et al., 2019). CCL20 promotes the recruitment of different CD4⁺ lymphocyte subtypes, including Th1, Th17, autoreactive, and Tregs (Arima et al., 2012; Reboldi et al., 2009; Sallusto et al., 2012).

IL-17 promotes the expression of CCL2 (Du et al., 2020) and CCL20 (Chabaud et al., 2001) and IL-15 is a potent T-cell chemoattractant that allows lymphocyte infiltration into the brain (Petranovic et al., 2014).

At 2 weeks of liver failure, CCL20, CX3CL1, IL-15, and IL-17 increase in plasma, providing an environment that promotes the recruitment of monocytes and lymphocytes in the brain. At 4 weeks, CX3CL1 and IL-15 remain increased in plasma and, in addition, CCL2, CCL20, and CX3CL1 are increased in cerebellum. These changes, together with the permeabilization of the BBB (reduction of occludin and ZO-1), would promote the recruitment and infiltration of monocytes-macrophages and CD4⁺ lymphocytes in the cerebellum of rats with steatohepatitis.

In hippocampus of rats with steatohepatitis, monocyte-macrophage and lymphocyte infiltration has also been observed, as well as an increase in CCL2 and CCL20.

One week of treatment with rifaximin prevents the increase of CCL20 and IL-15, but not of CX3CL1 and IL-17 in plasma. Two weeks of treatment with rifaximin normalize the levels of CX3CL1 and IL-15 in plasma, and of CCL2, CCL20 and CX3CL1 in cerebellum. This would help to prevent the infiltration of immune cells in cerebellum.

In the hippocampus, rifaximin prevents the infiltration of macrophages but not of CD4⁺ T lymphocytes and it prevents the increase of CCL2 but not of CCL20. This suggests that lymphocyte infiltration may be mediated by CCL20, with rifaximin being unable to prevent these alterations.

The effects of rifaximin on chemokine production would lead to the prevention of monocyte and lymphocyte infiltration in rats with steatohepatitis, and therefore this will contribute to the reduction of neuroinflammation by rifaximin. The results also suggest

that treatment with rifaximin during a single week is not sufficient to prevent some effects, which require a longer treatment of at least two weeks.

This thesis shows that rats with mild steatohepatitis present changes in peripheral inflammation similar to those associated with MHE in cirrhotic patients, with increased levels of IFN γ , TNF α , CCL20, CX3CL1, IL-15 and IL-17 and increased levels of levels of autoreactive CD4⁺ lymphocytes (Magas-Losada et al., 2017b). These changes are similar to those promoting infiltration of lymphocytes and monocytes in other pathologies such as multiple sclerosis, and result in the infiltration of macrophages and CD4⁺ T lymphocytes into the meninges of the cerebellum and hippocampus. The results reproduce the infiltration of lymphocytes in the meninges found in the cerebellum of deceased patients with mild steatohepatitis (Balzano et al., 2018), indicating that rats with steatohepatitis induced by CCl₄ injection are a good model to study the mechanisms involved in this infiltration, its functional and behavioral consequences, and therapeutic approaches to prevent or reverse the infiltration and/or its deleterious effects.

Microglia activation precedes the infiltration of the immune system cells, which suggests that neuroinflammation is initially triggered by activation by pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1, IL6, IL-17) of its receptors on endothelial cells, which induces the activation of microglia. This is associated with increased production in the cerebellum and hippocampus of chemokines (CCL2, CCL20 and CX3CL1) that act as attractants for monocytes and CD4⁺ T lymphocytes, enhancing their infiltration, leading to a sustained promotion of neuroinflammation in cerebellum and hippocampus and neuronal loss in the cerebellum, as occurs in the cerebellum of deceased patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (Balzano et al., 2018). This leads to impaired GABAergic and glutamatergic neurotransmission in cerebellum and hippocampus, resulting in cognitive and motor impairment.

Prevention by rifaximin of the infiltration of peripheral immune system cells contributes to reducing neuroinflammation and restoring neurotransmission, motor coordination and spatial learning and memory in rats with steatohepatitis.

It has been described that patients with NASH showing sufficiently high levels of hyperammonemia and inflammation present cognitive and motor impairment (Felipo et al., 2012) and this suggests that the process described in the rats used in this study would also occur in these patients. The results of this thesis support the idea that patients with NASH may already present cognitive and motor impairment before reaching cirrhosis,

and that early treatment of these patients with rifaximin would prevent the induction of these neurological alterations.

Liver damage progression is associated with the evolution of peripheral inflammation and changes in the immunophenotype. These alterations contribute to the maintenance of neuroinflammation and alterations in neurotransmission.

In cerebellum, during the stages of advanced steatohepatitis and cirrhosis, the same alterations described in rats with mild steatohepatitis are observed, and therefore rats with advanced liver disease continue to present motor incoordination. These data also support the idea that cerebellum is one of the first areas of the brain to be affected in the pathogenesis of MHE.

Hippocampus is subjected to more variations throughout the progression of liver disease, observing that different cognitive deficits modulated by this brain area are induced in different stages of liver damage, and are associated with different alterations in GABAergic and glutamatergic neurotransmission. In steatohepatitis stage, recognition memory of a new location and learning index in the radial maze would be impaired due to altered glutamatergic neurotransmission and in particular by NR1 and NR2A, and by TNF α released as a consequence of neuroinflammation. The alteration of working and reference memory in the radial maze in rats with advanced steatohepatitis would be induced by the increase in GluA1 and the decrease in GABA $\text{A}\alpha 1$. In cirrhotic rats, the impairment of recognition memory would be related to an increase in IL-1 β and an increase in GABA $\text{A}\alpha 1$ in the membrane.

Rifaximin treatment in rats with advanced steatohepatitis and cirrhosis normalizes many of the changes in the peripheral blood, preventing and/or restoring alterations in neuroinflammation and neurotransmission and consequently cognitive and motor impairment.

CONCLUSIONS

1. In rats with liver failure due to CCl₄ injection, motor incoordination appears already at the stage of steatohepatitis, and remains until cirrhosis. Rifaximin treatment prevents motor incoordination at both stages of liver failure.
2. In rats with steatohepatitis, impaired motor coordination is due to increased extracellular GABA levels in cerebellum, due to reduced GAT-1 membrane

expression, increased GAT-3 content and reversal of GAT-3 function. Rifaximin prevents all these alterations.

3. Alterations in cerebellar neurotransmission would be a consequence of neuroinflammation. Liver damage, in all its stages, induces activation of microglia and astrocytes and neuronal degeneration. Two or more weeks of treatment with rifaximin reverses microglia activation and prevents astrocytes activation and neuronal loss in cerebellum.
4. Different cognitive functions modulated in hippocampus are altered at different stages of liver damage. Spatial learning in the radial maze and object location memory are altered from the steatohepatitis stage, while reference and working memory become impaired at advanced steatohepatitis and object recognition memory is not impaired until the stage of cirrhosis.
5. Alterations in cognitive function are associated with changes in membrane expression in hippocampus of glutamate and GABA receptors. Spatial learning and memory impairment in steatohepatitis is associated with increased GluA2 and decreased NR1 and NR2A membrane expression. Reference and working memory impairment in advanced steatohepatitis is associated with increased GluA1 and decreased GABA_Aα1 and GABA_Aα5 membrane expression. Object recognition memory impairment in cirrhotic rats is associated with increased GABA_Aα1 membrane expression.
6. Rifaximin prevents all cognitive alterations. Prevention of spatial learning and memory impairment is associated with normalization of NR1 and NR2A membrane expression, and prevention of reference and working memory impairment with normalization of NR2A and GABA_Aα1 membrane expression.
7. Liver damage in all its stages induces activation of microglia and astrocytes and increases the content of TNFα and IL-1β in hippocampus. Alterations in membrane expression of GABA and glutamate receptors in hippocampus would be a consequence of neuroinflammation. Rifaximin prevents the increase in TNFα in rats with steatohepatitis but not in those with liver cirrhosis and reverses the increase in IL-1β in rats with advanced liver disease but not in rats with steatohepatitis. The

results suggest that TNF α increase would participate in inducing spatial learning and memory impairment in the steatohepatitis stage, while IL-1 β increase would contribute to impairment of working memory in advanced steatohepatitis and of object recognition memory in cirrosis.

8. Rats with mild steatohepatitis show changes in peripheral inflammation similar to those that trigger MHE in cirrhotic patients, with increased levels of IFN γ , TNF α , CCL20, CX3CL1, IL-15 and IL-17, increased levels of autoreactive CD4⁺ lymphocytes and permeabilization of the blood-brain barrier. These changes promote infiltration of macrophages and CD4⁺ lymphocytes in meninges of cerebellum and hippocampus and in choroid plexus of lateral ventricles.
9. In cerebellum and hippocampus infiltration of immune cells is associated with enhanced production of CCL2, CCL20 and CX3CL1 which would act as chemoattractants for monocytes and CD4⁺ lymphocytes, potentiating their infiltration, leading to sustained promotion of neuroinflammation and neuronal loss in cerebellum, as occurs in patients died with NASH.
10. Treatment with rifaximin reduces the pro-inflammatory environment in peripheral blood and prevents the permeabilization of the blood-brain barrier and T lymphocytes and macrophages infiltration in cerebellum and hippocampus. This reduces neuroinflammation and prevents impairment of neurotransmission, of motor coordination, and of spatial learning and memory in rats with steatohepatitis.
11. The results reported in rats with steatohepatitis support the idea that patients with NASH may already present cognitive and motor impairment before reaching cirrhosis and that early treatment of patients with liver damage with rifaximin would prevent induction or progression of these neurological alterations.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN.....	1
1. DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO.....	3
1.1 Esteatosis.....	5
1.2 Esteatohepatitis	6
1.3 Fibrogénesis hepática y progresión a cirrosis	8
1.4 Inducción de hiperamonemia por el fallo hepático	10
2. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA (EH).....	13
2.1 Encefalopatía hepática mínima (EHM).....	15
2.2 Alteraciones neurológicas en EH y EHM.....	15
2.2.1 Alteraciones neuropsiquiátricas	15
2.2.2 Alteraciones motoras	16
2.2.3 Alteraciones cognitivas	18
2.3 Patogénesis de la encefalopatía hepática: sinergia entre inflamación periférica e hiperamonemia en la inducción de EH.....	20
3. EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA	21
3.1 Papel de los diferentes tipos de leucocitos en sangre	22
3.1.1 Respuesta humoral: papel de los linfocitos B	23
3.1.2 Respuesta celular: papel de los linfocitos T	24
3.1.2.1 Diferenciación de los linfocitos T helper CD4	26
3.1.3 Papel de los monocitos y macrófagos	28
3.2 Mediadores de la inflamación: las citocinas	29
3.3 Neuroinflamación.....	32
3.3.1 Microglía	33
3.3.2 Astrocitos	34
3.3.3 Papel de la inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación	35
3.3.3.1 Infiltración de células del sistema inmune periférico en el SNC.....	36
3.4 Alteraciones en el sistema inmunitario asociadas al daño hepático	40
4. MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN AL DETERIORO COGNITIVO Y MOTOR EN EHM. PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN	43
4.1 Función cognitiva: memoria y aprendizaje	43
4.2 Alteraciones de la neurotransmisión en EHM	44
4.2.1 Alteraciones de la neurotransmisión en cerebelo	44
4.2.2 Alteraciones de la neurotransmisión en hipocampo	45
4.3 Papel de la neuroinflamación en EH.....	46
4.4 Papel de la inflamación periférica en EHM	51
5. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA ..	51
5.1 Microbiota.....	54
5.1.1 Microbiota en inmunidad e inflamación	55
5.1.2 Eje microbiota-intestino-cerebro	58
5.1.3 Papel de la microbiota intestinal en la patogénesis y prevención de la enfermedad hepática.....	60
5.2 Laxantes simples y trasplante de microbiota fecal.....	61

5.3	Prebióticos.....	62
5.4	Probióticos	63
5.5	Antibióticos.....	64
5.5.1	Rifaximina	64
6.	MODELOS ANIMALES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICA	69
6.1	Modelo de ratas con fallo hepático progresivo inducido por tetracloruro de carbono (CCl ₄)	71
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....		74
MATERIALES Y MÉTODOS.....		79
1.	ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	81
2.	ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL DAÑO HEPÁTICO	82
3.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMONIO EN PLASMA.....	82
4.	ENSAYOS DE COORDINACIÓN MOTORA.....	83
4.1	Rotarod.....	83
4.2	Beam walking	83
5.	TESTS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	84
5.1	Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y	84
5.2	Análisis de la función cognitiva en el laberinto radial de 8 brazos	85
5.3	Tests de reconocimiento de objetos: reconocimiento de objeto nuevo (NOR) y de nueva localización de objeto (NOL).....	87
6.	MICRODIÁLISIS IN VIVO EN EL CEREBELO.....	88
6.1	Determinación de GABA y glutamato en muestras de microdiálisis en cerebelo in vivo por cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS)	89
7.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE SUBUNIDADES DE TRANSPORTADORES Y RECEPTORES DE NEUROTRANSMISORES EN CEREBELO E HIPOCAMPO.....	90
8.	PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS DE CEREBELO PARA WESTERN BLOT.....	91
9.	ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	91
10.	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	94
10.1	Análisis de imágenes de inmunohistoquímica	96
10.1.1	Análisis de la activación de microglía (IBA-1).....	96
10.1.2	Análisis de la activación de astrocitos (GFAP).....	97
10.1.3	Análisis del contenido de TNF- α e IL-1 β	97
10.1.4	Análisis de la infiltración de linfocitos CD4 ⁺	98
10.1.5	Análisis de la infiltración de macrófagos	98
10.1.6	Análisis del contenido de CCL20 y CX3CL1	99
10.1.7	Análisis del contenido de CCL2.....	99
11.	ANÁLISIS DE LA DENSIDAD NEURONAL.....	100
12.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE FACTORES INFLAMATORIOS EN PLASMA.....	100
12.1	Determinación de TNF α	100
12.2	Determinación de citocinas por western blot	100
13.	ESTUDIO DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN SANGRE TOTAL MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	101

13.1	Análisis de linfocitos T naïve y de memoria	105
13.2	Análisis de linfocitos T reguladores	105
13.3	Análisis de linfocitos T autoreactivos	105
13.4	Análisis de linfocitos B	106
13.5	Análisis de monocitos	106
14.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	106
RESULTADOS.....		111
1.	LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE CCL ₄ INDUCE DAÑO HEPÁTICO PROGRESIVO	113
2.	HIPERAMONEMIA EN RATAS CON DISTINTO GRADO DE DAÑO HEPÁTICO.....	115
3.	LAS RATAS CON ESTEATOHEPATITIS MUESTRAN INCOORDINACIÓN MOTORA QUE MEJORA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA	116
4.	EL TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA MEJORA LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE DE UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN CONDICIONADA EN EL LABERINTO EN Y EN RATAS CON ESTEATOHEPATITIS	118
5.	EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA ESPACIALES EMPEORAN CON EL GRADO DE DAÑO HEPÁTICO. LA RIFAXIMINA MEJORA EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIALES	118
6.	EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCL ₄ ALTERA LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE UNA NUEVA LOCALIZACIÓN. LA RIFAXIMINA PREVIENE ESTA ALTERACIÓN EN RATAS CON ESTEATOHEPATITIS PERO NO EN RATAS CIRRÓTICAS.....	122
7.	LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE UN NUEVO OBJETO ESTÁ ALTERADA EN RATAS CON CIRROSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR CCL ₄ Y SE REVIERTE MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA.....	123
8.	ALTERACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN Y NEUROINFLAMACIÓN EN CEREBELO.....	125
8.1	La esteatohepatitis induce aumento de los niveles extracelulares de GABA y glutamato en cerebelo que se previene con el tratamiento con rifaximina	125
8.2	Alteración de la expresión en membrana de los transportadores de glutamato y GABA en cerebelo en ratas con distintos grados de fallo hepático. Efectos de la rifaximina	126
8.3	El daño hepático induce neuroinflamación en el cerebelo. Efectos de la rifaximina	128
8.4	El daño hepático induce aumento de TNF α en cerebelo, el cual se previene mediante el tratamiento con rifaximina en el estadio de esteatohepatitis pero no en el de esteatohepatitis avanzada y cirrosis	131
8.5	El daño hepático induce pérdida neuronal en el cerebelo. Efectos de la rifaximina ..	134
9.	ALTERACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN Y NEUROINFLAMACIÓN EN HIPOCAMPO....	137
9.1	Alteración de la expresión en membrana de subunidades de los receptores AMPA, NMDA y GABA en hipocampo de ratas con distintos grados de fallo hepático. Efectos de la rifaximina	137
9.2	El daño hepático induce neuroinflamación en el hipocampo. Efectos de la rifaximina	145

9.3	Las ratas con esteatohepatitis leve tienen disminuidos los niveles de IL-1 β en CA1, pero el contenido de IL-1 β aumenta en ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis. El tratamiento con rifaximina revierte este aumento	149
9.4	Las ratas con daño hepático tienen aumentados los niveles de TNF α en CA1. El tratamiento con rifaximina revierte este aumento en ratas con esteatohepatitis pero no en ratas cirróticas	151
10.	LA INDUCCIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO SE ASOCIA CON UN RÁPIDO AUMENTO DE LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA	153
11.	ESTUDIO DE POBLACIONES LEUCOCITARIAS EN SANGRE TOTAL MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	156
11.1	Caracterización del inmunofenotipo en ratas con esteatohepatitis leve	156
11.1.1	Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T helper y un aumento de los linfocitos T citotóxicos	156
11.1.2	Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T de memoria	157
11.1.3	Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T reguladores CD8 ⁺	158
11.1.4	Las ratas con esteatohepatitis leve muestran un aumento de los linfocitos T autoreactivos CD4 ⁺	158
11.1.5	Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos B	159
11.1.6	Las ratas con esteatohepatitis leve no presentan activación de monocitos ..	159
11.2	Caracterización del inmunofenotipo en ratas con esteatohepatitis	160
11.2.1	En ratas con esteatohepatitis están aumentados los linfocitos T de memoria	160
11.2.2	Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento de linfocitos T reguladores	161
11.2.3	Las ratas con esteatohepatitis no muestran cambios en los niveles de linfocitos T autoreactivos	162
11.2.4	Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento de linfocitos B que se previene mediante el tratamiento con rifaximina	163
11.2.5	Las ratas con esteatohepatitis no tienen activación de monocitos.....	163
11.3	Caracterización del inmunofenotipo en ratas con esteatohepatitis avanzada	164
11.3.1	Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran un aumento de linfocitos T de memoria	164
11.3.2	Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran un aumento de linfocitos T reguladores CD4 ⁺ que se previene mediante el tratamiento con rifaximina	165
11.3.3	Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran aumento de linfocitos T autoreactivos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina	166
11.3.4	Las ratas con esteatohepatitis avanzada no tienen alterados los niveles de linfocitos B	167
11.3.5	Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran activación de monocitos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina.....	167
11.4	Caracterización del inmunofenotipo en ratas con cirrosis	168

11.4.1	Las ratas con cirrosis muestran un aumento de linfocitos T de memoria	168
11.4.2	Las ratas con cirrosis muestran un aumento de linfocitos T reguladores.	
	Efectos del tratamiento con rifaximina	169
11.4.3	Las ratas con cirrosis muestran aumento de linfocitos T autoreactivos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina	169
11.4.4	Las ratas con cirrosis no tienen alterados los niveles de linfocitos B	170
11.4.5	Las ratas con cirrosis muestran activación de monocitos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina.....	170
12.	LAS RATAS CON FALLO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCL ₄ PRESENTAN INFILTRACIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN CEREBELO QUE SE PREVIENE MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA.....	171
12.1	Las ratas con esteatohepatitis presentan infiltración de linfocitos T CD4 ⁺ en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina	171
12.2	Las ratas con esteatohepatitis tienen infiltración de monocitos/macrófagos en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina	172
12.3	La infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos en el cerebelo es promovida por quimiocinas como CCL2, CCL20 y CX3CL1.....	174
12.4	La disminución de las proteínas de uniones estrechas ocludina y ZO-1 contribuye a la infiltración de células del sistema inmune en cerebelo de ratas con esteatohepatitis. La rifaximina previene su disminución.....	177
13.	LAS RATAS CON FALLO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCL ₄ PRESENTAN INFILTRACIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN HIPOCAMPO. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON RIFAXIMINA ...	178
13.1	Las ratas con esteatohepatitis presentan infiltración de linfocitos T CD4 ⁺ en hipocampo que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina.....	179
13.2	Las ratas con esteatohepatitis tienen infiltración de monocitos/macrófagos en hipocampo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina.....	180
13.3	La infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos en hipocampo es promovida por quimiocinas como CCL2 y CCL20	182
	DISCUSIÓN.....	185
1.	MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN AL DETERIORO COGNITIVO Y MOTOR EN EHM.....	187
1.1	Deterioro de la coordinación motora. Alteraciones en cerebelo	187
1.2	Deterioro cognitivo. Alteraciones en hipocampo	192
2.	PAPEL DE LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA EN LA INDUCCIÓN DE NEUROINFLAMACIÓN ...	200
2.1	Cambios en citocinas periféricas asociadas al daño hepático	200
2.2	Alteraciones en el inmunofenotipo asociadas al daño hepático.....	202
2.3	Infiltración de células del sistema inmune periférico en el SNC	207
2.4	Activación de microglía	209
	CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	215
	BIBLIOGRAFÍA.....	223

AFLD	enfermedad del hígado graso alcohólico
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
APC	células presentadoras de antígeno
APS	persulfato de amonio
ASH	esteatohepatitis alcohólica
ATP	adenosina trifosfato
BCA	ácido bicinconínico
BCIP	bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BDL	ligadura del conducto biliar
BHE	barrera hematoencefálica
BSA	albumina de suero bovino
BS3	del inglés “ <i>bis-sulfosuccinimidyl-suberate</i> ”
CCl ₄	tetracloruro de carbono
CCL2	del inglés “ <i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i> ” (o MCP-1 (del inglés “ <i>monocyte chemotactic protein-1</i> ”))
CCL20	del inglés “ <i>C-C Motif Chemokine Ligand 20</i> ”
CCR6	del inglés “ <i>C-C Motif Chemokine Receptor 6</i> ”
CD	del inglés “ <i>cluster of differentiation</i> ”
COX-2	ciclooxigenasa-2
CX3CL1	(<i>C-X3-C motif</i>) ligando 1
CX3CR1	(<i>C-X3-C motif</i>) receptor 1
DAB	diaminobenzidina
DAMP	patrones moleculares asociados a daños
DC	células dendríticas
ECM	matriz extracelular
EGTA	ácido etilenglicol-bis-N', N', N', N'-tetraacético
EH	encefalopatía hepática
EHM	encefalopatía hepática mínima
FMT	trasplante de microbiota fecal
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA _A	receptor de GABA tipo A

GAT-1	transportador de GABA 1
GAT-3	transportador de GABA 3
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLAST	transportador de glutamato/aspartato
Glu	glutamato
GluA1	subunidad 1 del receptor AMPA
GluA2	subunidad 2 del receptor AMPA
GMP	guanosín monofosfato
GMPc	guanosín monofosfato cíclico
GTP	guanosín trifosfato
IBA-1	del inglés “ <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> ”
Igs	inmunoglobulinas
ILs	interleucinas
IFN γ	interferón gamma
IMP	inosina monofosfato
IP	intraperitoneal
KC	células de Kupffer
LCA	líquido cefalorraquídeo artificial
LPS	lipopolisacárido
MAMP	patrones moleculares asociados a microbios
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MIP	del inglés “ <i>macrophage inflammatory protein</i> ”
NAD	nicotinamida adenina dinucleótida
NAFLD	enfermedad del hígado graso no alcohólico
NASH	esteatohepatitis no alcohólica
NBT	del inglés “ <i>nitroblue tetrazolium</i> ”
NF-kB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	células natural killer
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	óxido nítrico
NOL	del inglés “ <i>Novel Object Location</i> ”

NOR	del inglés “ <i>Novel Object Recognition</i> ”
NR1	subunidad 1 del receptor NMDA
NR2A	subunidad 2A del receptor NMDA
NR2B	subunidad 2B del receptor NMDA
n.s.	no significativo
PAMP	patrón molecular asociadas a patógenos
PB	tampón fosfato
PBS	tampón fosfato salino
PCS	anastomosis porto-cava
PET	tomografía de emisión de positrones
PFA	paraformaldehído
PGE2	prostaglandina E2
PHES	del inglés “ <i>psychometric hepatic encephalopathy score</i> ”
PVDF	polifluoruro de vinilideno
SCFAs	ácidos grasos de cadena corta
SEM	error estándar de la media
SNC	sistema nervioso central
SNE	sistema nervioso entérico
SNr	sustancia nigra pars reticulata
STAT3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
TCR	receptor de célula T
TEMED	tretrametilenetilendiamina
Tfh	linfocitos T foliculares
TGFβ	factor de crecimiento transformante beta
Th	del inglés “ <i>Helper</i> ”
TLR	receptor Toll-like
TNFα	factor de necrosis tumoral alfa
Tregs	T reguladoras
TSPO	proteína translocadora
u.a.	unidades arbitrarias

INTRODUCCIÓN

1. Daño hepático crónico

Una función importante del hígado es filtrar la sangre que proviene del tracto digestivo, antes de redistribuirla a la circulación periférica. El hígado también está involucrado en la secreción de bilis, el metabolismo de los macronutrientes, el soporte del sistema inmunológico, la regulación del volumen sanguíneo, el control endocrino, la homeostasis del colesterol y de los lípidos, y en la descomposición de compuestos xenobióticos, participando en el metabolismo de diferentes medicamentos (Trefts et al., 2017).

El hígado recibe un doble suministro de sangre: la vena porta proporciona el 70-75% del flujo sanguíneo hepático, mientras que la arteria hepática proporciona el 25-30% restante (Figura 1). La sangre que proviene de la vena porta se caracteriza por estar parcialmente oxigenada y ser rica en nutrientes absorbidos por el intestino delgado, mientras que la sangre que proviene de la arteria hepática está altamente oxigenada. La vena porta y la arteria hepática entran al hígado a través del hilio, una fisura transversal en la superficie inferior del mismo. La sangre portal y arterial se encuentran en los sinusoides hepáticos y, tras el procesamiento de los nutrientes, el hígado drena la sangre a la circulación sistémica a través del sistema venoso hepático, que confluye en la vena cava inferior (Abdel-Misih et al., 2010). Debido a la anatomía de la circulación portal hepática, toda la sangre proveniente del tracto digestivo pasa a través del hígado (Figura 1).

El hígado se compone de distintos tipos de células, con diferente origen embriológico. El tipo celular más abundante son los hepatocitos, que representan la mayoría de las células epiteliales del hígado. Son células poliédricas que forman el parénquima hepático. Son responsables del funcionamiento general del órgano, estando implicadas en la metabolización de sustancias derivadas de la digestión y en la desintoxicación de productos tóxicos para el organismo (Malarkey et al., 2005). Otro tipo celular son las células estrelladas, que generalmente se encuentran en un estado inactivo acumulando vitamina A en gotas de lípidos. En condiciones de daño hepático se induce la activación de las células estrelladas y su proliferación, lo que lleva a la pérdida de depósitos de vitamina A. Las células estrelladas son responsables de la acumulación y organización del colágeno tras una lesión hepática. Las células de Kupffer se consideran macrófagos residentes del hígado, y pueden mostrar un fenotipo tanto anti- como pro- inflamatorio según las condiciones del microambiente. Las células endoteliales sinusoidales del

hígado forman placas fenestradas en la luz sinusoidal, lo que permite el intercambio de proteínas y partículas entre células sanguíneas y hepáticas (Trefts et al., 2017).

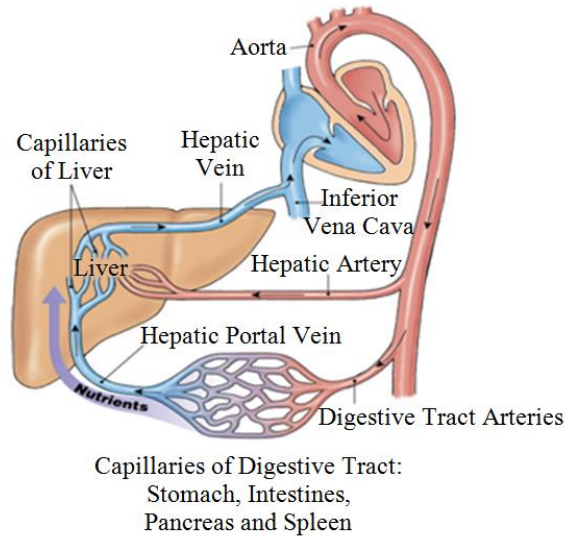


Figura 1. El sistema portal hepático. La sangre entra al hígado por dos caminos, la arteria hepática que provee sangre oxigenada y la vena porta que transporta sangre poco oxigenada pero rica en nutrientes del aparato digestivo, el bazo, el páncreas. Dentro del hígado, ambos tipos de sangre se mezclan y después de ser filtrada por los sinusoides hepáticos, abandona el hígado a través de las venas hepáticas. (Al-Ani, 2015).

La organización estructural del hígado está estrechamente relacionada con su función inmune. El pequeño tamaño de los sinusoides facilita el contacto entre los linfocitos y las células presentadoras de antígenos, y en caso de perturbación del flujo sinusoidal induce extravasación de linfocitos. Dentro del hígado se encuentran varios tipos de linfocitos, incluidas células T $CD4^+$ y $CD8^+$, células natural killer (NK), así como células residentes presentadoras de antígeno, células de Kupffer y células dendríticas (DC) hepáticas residentes (Racanelli et al., 2006).

El hígado presenta una capacidad regenerativa única, el tejido hepático se reemplaza rápidamente incluso después de una pérdida de masa de hasta el 75% (Häussinger et al., 2011). Sin embargo, el hígado es susceptible a un amplio espectro de agresiones metabólicas, microbianas, circulatorias, tóxicas y neoplásicas. Las causas más importantes de lesión hepática incluyen infecciones, respuestas autoinmunes, hepatotoxicidad inducida por fármacos y tóxicos, trastornos metabólicos y lesiones mecánicas. Después de la lesión, el hígado muestra un limitado repertorio de manifestaciones morfológicas; estas incluyen inflamación, lesión hepatocelular, necrosis y apoptosis, remodelación vascular, regeneración, fibrosis y neoplasia (Burt et al., 2018a).

Las enfermedades hepáticas más comunes e importantes son la hepatitis viral, la enfermedad del hígado graso alcohólico (AFLD, del inglés “*alcoholic fatty liver disease*”), la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, del inglés “*non-alcoholic fatty liver disease*”), la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (Tannapfel et al., 2011).

La insuficiencia hepática aguda es la pérdida de la función hepática que ocurre rápidamente, en días o semanas, generalmente en personas sin enfermedades hepáticas preexistentes. La insuficiencia hepática aguda es menos frecuente que la insuficiencia hepática crónica, que se manifiesta más lentamente.

La insuficiencia hepática crónica es una entidad clínica frecuente. Representa la octava causa de muerte en personas entre 18 y 55 años y la quinta causa principal de muerte en todo el mundo, es la razón más común de hospitalización en las unidades de gastroenterología y hepatología y es la principal indicación de trasplante de hígado (Olson et al., 2016). Además de los problemas asociados con la insuficiencia hepática, los pacientes muestran complicaciones relacionadas con la hipertensión portal. Pacientes con insuficiencia hepática pueden sufrir encefalopatía, que deriva del insuficiente metabolismo hepático del amonio y otras sustancias tóxicas y de la inflamación asociada al fallo hepático (Fernández et al., 2010; Felipo, 2013).

Una vez iniciado el daño hepático crónico, se desarrollan tres etapas a lo largo de la enfermedad: esteatosis hepática, esteatohepatitis y fibrogénesis hepática, y cirrosis.

1.1 Esteatosis

La esteatosis consiste en la acumulación de gotitas de grasa, compuestas de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, en el citoplasma de las células del parénquima hepático. En un hígado normal, los lípidos representan aproximadamente el 5% del peso húmedo total. Esto puede aumentar hasta un 50% en la esteatosis, lo que resulta en una hepatomegalia marcada (el hígado puede llegar a pesar hasta 5 kg). En este estadio el hígado tiene un aspecto amarillo pálido y una consistencia grasosa; el color es causado en gran medida por los carotenos retenidos.

La expresión "esteatosis microvesicular" se refiere a la presencia de pequeñas gotas sin núcleo, que suelen aparecer en caso de daño agudo por hígado graso durante el embarazo o debido a la toxicidad del ácido valproico. Por otro lado, la expresión "esteatosis macrovesicular" indica la presencia de gotas más grandes y nucleadas, que

se asocian con obesidad, diabetes e infecciones por el virus de la hepatitis C. Con la progresión de la patología varias microvesículas pueden fundirse para generar una macrovesícula. La esteatosis macrovesicular es la forma más común.

AFLD y NAFLD, son los dos tipos principales de enfermedad de hígado graso, ambos caracterizados por una deposición variable de lípidos ($> 5\%$) en los hepatocitos. En ambas patologías la esteatosis hepática es de tipo macrovesicular, pero en algunas ocasiones pueden aparecer los dos tipos de vesículas (Adams et al., 2005a y 2005b; Crabb et al., 2004; Zafrani, 2004). En su etapa final, ambos derivan a fibrosis o cirrosis (Tannapfel et al., 2011).

El consumo crónico de alcohol daña las mitocondrias, el retículo endoplasmático y otras estructuras celulares, inhibiendo la oxidación de los ácidos grasos (Crabb et al., 2004; Nakajima et al., 2004). La acumulación de grasa en AFLD y NAFLD se debe principalmente a la síntesis de ácidos grasos y a la inhibición de su oxidación (Adams et al., 2005a y 2005b; Browning et al., 2004; Evans et al., 2004; Hamaguchi et al., 2005; Hashimoto et al., 2000; Matsusue et al., 2003; Yu et al., 2003). La esteatosis hepática en AFLD conduce a la rotura y la muerte de los hepatocitos, y a la consecuente liberación de triacilglicerol que, junto con los ácidos grasos de cadena muy larga no metabolizados, empeoran el daño hepático. El 50% de los diabéticos, el 76% de los obesos y el 100% de los obesos mórbidos con diabetes sufren NAFLD (Adams et al., 2005a).

1.2 Esteatohepatitis

La excesiva acumulación de lípidos en los hepatocitos puede conducir a formas más dañinas de insuficiencia hepática, como esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y daño hepático terminal (Gao et al., 2011). Un desarrollo severo y persistente de esteatosis hepática conduce a la aparición de esteatohepatitis, que en su forma leve es inocua, reversible y no progresa si la causa subyacente cesa o se elimina (Crabb et al., 2004; Evans et al., 2004; Hamaguchi et al., 2005).

La progresión a esteatohepatitis alcohólica (ASH) o no alcohólica (NASH) depende de la perduración y gravedad de la causa de la esteatosis hepática. NASH y ASH presentan una gama parecida de lesiones patológicas. La única característica distintiva consiste en el bajo consumo de alcohol por parte de los pacientes con NASH. La AFLD surge tras un consumo de etanol de más de 20 g/día para las mujeres y 30 g/día para los hombres

durante 20 años o más (Adams et al., 2005a; Crabb et al., 2004; Mandayam et al., 2004, Zafrani et al., 2004).

Algunas alteraciones difieren en su grado según la etiología de la esteatohepatitis. Tanto en ASH como en NASH aparece esteatosis macrovesicular asociada con características necroinflamatorias tales como hepatocitos balonizados, células apoptóticas, presencia de hialina de Mallory y/o megamitocondrias en el citoplasma de hepatocitos, infiltración de células inflamatorias y macrófagos, y lipogranulomas. (Adams et al., 2005b; Browning y Horton, 2004, Crabb et al., 2004; Hamaguchi et al., 2005; Rao et al., 2004; Zafrani, 2004).

La patogénesis de ASH y NASH es multifactorial. El hígado esteatótico presenta una mayor vulnerabilidad a las especies reactivas del oxígeno, a las adipocitocinas secretadas por el tejido adiposo y a las endotoxinas derivadas del intestino (Day et al., 1998) que activan la respuesta inflamatoria en el hígado graso. El factor determinante en el desarrollo de esteatohepatitis parece estar directamente relacionado con la ruptura o apoptosis de los hepatocitos fuertemente esteatóticos y la consecuente liberación de triglicéridos y ácidos grasos tóxicos. La sobrecarga de ácidos grasos en los hepatocitos actúa como un sustrato y un inductor del citocromo microsomal P-450 2E1 y de la activación del sistema de oxidación de los ácidos grasos, generando especies reactivas de oxígeno que llevan a la célula a un estado de estrés oxidativo. El estrés oxidativo provoca la liberación por parte de las células de Kupffer de citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Day et al., 1998; Rao et al., 2004). Tanto las especies reactivas del oxígeno como el etanol activan las células estrelladas que intervienen en la fibrogenesis. El sistema inmune también se ve implicado en este proceso, por un lado induciendo la respuesta inflamatoria en respuesta a la liberación de productos de peroxidación de lípidos y de proteínas oxidadas, y por otro lado mediante mecanismos de autoinmunidad hacia componentes liberados por los hepatocitos dañados. Además, productos bacterianos derivados del intestino, como el lipopolisacárido y la endotoxina, activan las células de Kupffer, conduciendo a la producción de citocinas y reducción de la adiponectina periférica. Aunque no se conoce el papel exacto de las adipocitocinas (adiponectina y leptina) en NASH, ambas se ven sobreexpresadas por las células estrelladas en la resistencia a la insulina. Se considera generalmente que la leptina promueve la fibrosis (Leclercq et al., 2002) y la adiponectina inhibe la fibrosis y provoca la apoptosis de las células estrelladas (Ding et al., 2005) (Figura 2).

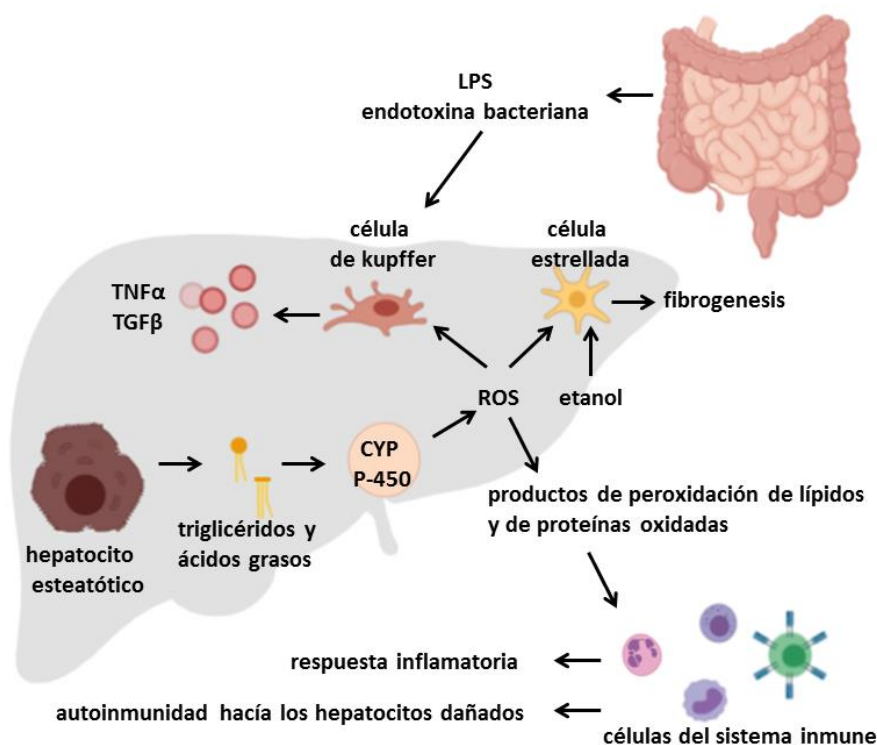


Figura 2. Patogénesis de ASH y NASH (LPS: lipopolisacárido). Ver explicación en el texto.

Debido al amplio espectro de alteraciones histopatológicas asociadas a la esteatohepatitis, para su clasificación es importante tener en cuenta diversos parámetros, como el grado de esteatosis y de actividad inflamatoria, la magnitud de la lesión hepatocelular y la extensión de la fibrosis. La escala más común para esta clasificación es la semicuantitativa de Brunt, posteriormente editada por Kleiner y reconocida por el “Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network”, patrocinado por el “National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases” de EE.UU. (Kleiner et al., 2005; Brunt et al., 2000). La clasificación se realiza mediante una tinción con Hematoxilina-Eosina y una tinción tricromica de Masson. Se asigna una puntuación a cada una de las 5 grandes categorías consideradas en la escala (esteatosis, inflamación, fibrosis, ballooning hepatocelular y otras características) y la suma no ponderada de todas las puntuaciones es la puntuación final.

1.3 Fibrogénesis hepática y progresión a cirrosis

La necroinflamación es un evento en serie de necrosis regulada que desencadena inflamación, necrosis regulada secundaria, y así sucesivamente. En esteatohepatitis conduce a la activación de las células estrelladas y a fibrosis hepática, que refleja un

desequilibrio entre la producción y la degradación de la matriz extracelular (ECM). En un hígado sano la ECM sinusoidal se compone predominantemente por una matriz basal de tipo membranoso que contiene colágeno no formador de fibrillas, de tipo IV y VI, y pequeñas cantidades de colágeno de tipos I y III. Por otro lado en los estadios de fibrosis y cirrosis se depositan en el espacio de Disse fibronectina, laminina, colágeno tipo III, pequeñas cantidades de colágeno tipo I, proteoglicanos, tenascina, decorina y biglucano (Burt en al. 2018b).

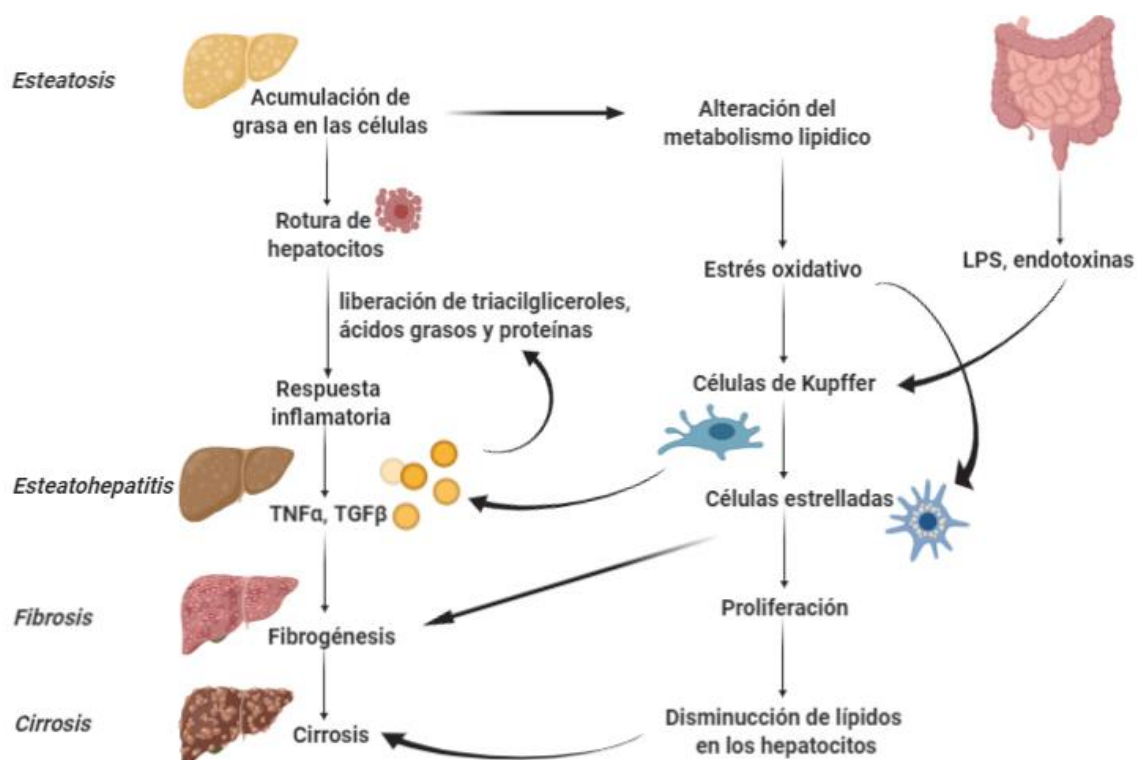


Figura 3. Etapas del daño hepático crónico. La acumulación de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol en el citoplasma de las células del parénquima hepático conduce a esteatosis. La ruptura o apoptosis de los hepatocitos esteatóticos y la consecuente liberación de triglicéridos y ácidos grasos tóxicos son factores determinantes en el desarrollo de esteatohepatitis. La sobrecarga de ácidos grasos en los hepatocitos activa el sistema de oxidación de los ácidos grasos, generando especies reactivas de oxígeno que llevan a la célula a un estado de estrés oxidativo. Como consecuencia de la liberación de productos de peroxidación de lípidos y de proteínas oxidadas se produce una respuesta inflamatoria. El estrés oxidativo provoca la liberación por parte de las células de Kupffer de TNF α y TGF β , y activa las células estrelladas que intervienen en la fibrogenesis. Productos bacterianos derivados del intestino, como el lipopolisacárido y la endotoxina, activan las células de Kupffer conduciendo a la producción de citocinas. Las células estrelladas empiezan a proliferar en respuesta a la apoptosis y a la lesión de las células hepáticas, y conforme aumenta la frecuencia de la proliferación celular, se puede observar una disminución de la acumulación de grasa en los hepatocitos. En etapas finales la fibrogénesis y la proliferación hepatocelular inducen cirrosis. Se da una explicación más detallada en el texto.

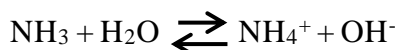
En etapas tempranas la fibrosis es de tipo perisinusoidal, perivenular (alrededor de las venas hepáticas terminales) y pericelular. Tras la lesión crónica del tejido hepático, la activación de las células estrelladas y de otras células lleva a la pérdida de gotas de

grasa, aumento en el número y tamaño de las células, y su transdiferenciación genotípica a células de tipo proliferativo, fibrogénico y contráctiles. Si esta fibrogenesis continúa se verifica una fibrosis en puente, que comporta la formación de septos fibrosos entre las vénulas hepáticas terminales y las tríadas portales, además de un tracto fibroso entre los espacios porta (Sarem, et al. 2006).

La apoptosis y la lesión de las células hepáticas actúan como estímulos para la división y proliferación de las células estrelladas hepáticas. Conforme aumenta la frecuencia de la proliferación celular, se puede observar una disminución de la acumulación de grasa en los hepatocitos, tanto que en AFLD, en fase avanzada con cirrosis, la esteatosis desaparece, debido a que las células de nueva generación presentan resistencia a la acumulación de grasa. Estas nuevas células causan una alteración en la fisiología del hígado y la formación de nódulos hepáticos durante el desarrollo de la fibrosis hepática. Finalmente, esta fibrogénesis agresiva, así como la continua proliferación hepatocelular, llevan al desarrollo de la cirrosis hepática.

1.4 Inducción de hiperamonemia por el fallo hepático

El amonio es un ion poliatómico cargado positivamente derivado del metabolismo de compuestos nitrogenados y se produce en todas las células del organismo como resultado de la degradación de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos nitrogenados. En solución acuosa el amoniaco (NH_3) se encuentra en equilibrio con el ion amonio (NH_4^+). A pH fisiológico la reacción favorece la formación de NH_4^+ :



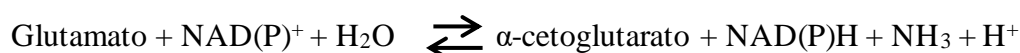
El NH_3 es un gas capaz de atravesar libremente las membranas celulares. Sin embargo, el ion NH_4^+ necesita transportadores para cruzarlas, como los que se han descrito en hígado y cerebro (Amlal y Soleimani, 1997; Ramirez et al., 1999; Marcaggi y Coles, 2001; Weiner, 2004).

El amonio es fundamental en la homeostasis del nitrógeno, participando en la síntesis de importantes compuestos para el organismo como la glutamina o el glutamato. Sin embargo, cuando está presente en sangre y cerebro a concentraciones muy altas, resulta tóxico causando alteraciones funcionales en el sistema nervioso central (Gerok y Haussinger, 1984; Felipe y Butterworth, 2002). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, los niveles de amonio en sangre ($\approx 40 \mu\text{M}$ en humanos, $\approx 150 \mu\text{M}$ en rata) y

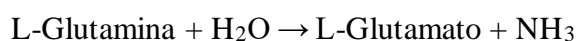
en cerebro están estrictamente controlados por diversas reacciones que mantienen el equilibrio entre su formación y su eliminación.

En mamíferos, la formación de amonio está catalizada principalmente por las enzimas (i) glutamato deshidrogenasa, (ii) glutaminasa y (iii) enzimas del ciclo de los nucleótidos de purina:

(i) la glutamato-deshidrogenasa se localiza principalmente en hígado y en cerebro. Cataliza la siguiente reacción:



(ii) la glutaminasa se encuentra en hígado, riñón, músculo, intestino y cerebro. En cerebro es abundante en las terminaciones sinápticas de las neuronas glutamatérgicas, participando en el ciclo glutamato-glutamina con la reacción:



(iii) las enzimas del ciclo de los nucleótidos de purinas son especialmente abundantes en músculo y cerebro. Son muy importantes en la generación de una porción considerable de amonio en cerebro (Schultz y Lowenstein, 1978):

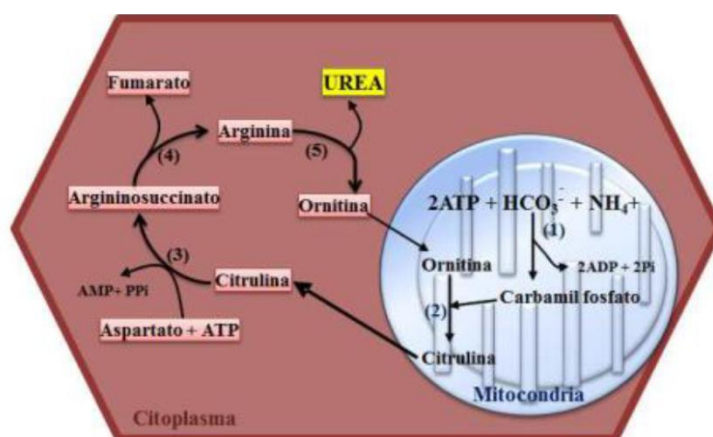
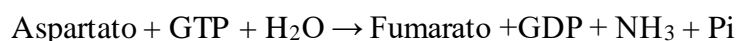
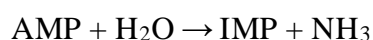
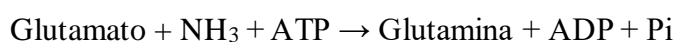


Figura 4. Ciclo de la urea en el hígado. En la mitocondria, el amonio es incorporado por la carbamil fosfato-sintetasa (1) al carbamil fosfato, que se combina con ornitina por la ornitina-transcarbamilasa (2) para formar citrulina. Ya en el citoplasma, la argininosuccinato-sintetasa (3) combina la citrulina con el aspartato para formar argininosuccinato, que es descompuesto en fumarato y arginina por la argininosuccinasa (4). La arginasa (5) cataliza la ruptura de la arginina en ornitina y urea. La ornitina vuelve a la mitocondria para iniciar de nuevo el ciclo y la urea es liberada del hígado a la sangre y elimina en la orina (Cabrera-Pastor, 2014).

En los animales ureotélicos, incluidos los seres humanos, el amonio es eliminado principalmente en el hígado, por medio del ciclo de la urea (Figura 4). Este ciclo lleva a la incorporación del amonio en la urea, la cual se expulsa por la orina.

En órganos que no expresan todos los enzimas del ciclo de la urea, como cerebro y músculo, el amonio es detoxificado principalmente por la glutamina sintetasa. Esta enzima es particularmente importante en el sistema nervioso central, donde se localiza en los astrocitos (Martinez-Hernandez et al., 1977; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979), interviniendo en el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 5). La glutamina sintetasa une el ion amonio al glutamato formando glutamina en una reacción que consume ATP:



La glutamina sintetizada se libera al torrente sanguíneo permitiendo el transporte del amonio en forma no tóxica desde el cerebro hasta el hígado, donde la glutamina es escindida por la glutaminasa, produciendo amonio que se eliminará a través del ciclo de la urea.

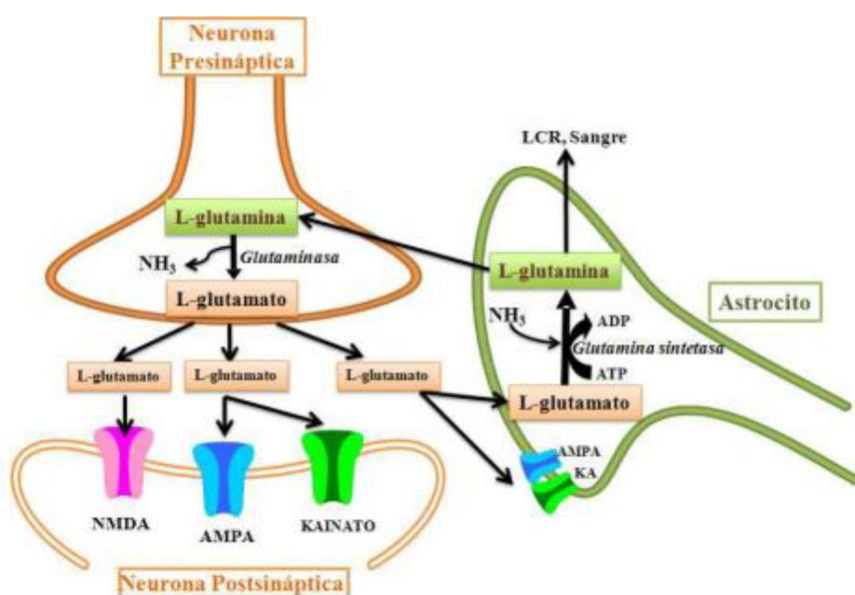


Figura 5. Ciclo glutamato-glutamina en sinapsis glutamatérgicas del cerebro. La neurona presináptica libera glutamato a la hendidura sináptica, que activa los correspondientes receptores (AMPA, NMDA y Kainato principalmente) en la neurona post-sináptica. El exceso de glutamato es recaptado rápidamente por transportadores situados tanto en las propias neuronas como en los astrocitos que rodean a la sinapsis. En los astrocitos, la glutamina-sintetasa incorpora amonio al glutamato transformándolo en glutamina. Esta glutamina es liberada al medio extracelular y captada por neuronas, donde es transformada de nuevo por la glutaminasa en glutamato, que vuelve a incluirse en vesículas sinápticas para su liberación. (Cabrera-Pastor, 2014).

Cuando ocurre un daño hepático, la detoxificación del amonio no se lleva a cabo adecuadamente, causando un aumento de sus niveles en sangre y cerebro.

Los niveles elevados de amonio alteran la transmisión sináptica. El ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 5) es el principal mecanismo por el que se recicla el neurotransmisor glutamato. Por tanto, este ciclo es esencial para mantener un correcto funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica. El amonio tiene un papel importante en este ciclo y el aumento de amonio en hiperamonemia puede afectar su función.

2. Encefalopatía Hepática (EH)

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo consecuencia de un fallo hepático. Según la naturaleza de la enfermedad hepática, que puede ser debida a un fallo hepático agudo o crónico (como la cirrosis), pueden manifestarse diferentes alteraciones cerebrales y neurológicas y, por lo tanto, diferentes formas de EH, cada una de las cuales está mediada por mecanismos diferentes y requiere tratamientos distintos (Felipo, 2013).

Los pacientes con encefalopatía hepática presentan un amplio espectro de anomalías neuropsiquiátricas, que incluyen alteración del ciclo sueño-vigilia, de la función cognitiva e intelectual, de la actividad motora y de la coordinación, así como alteraciones en la personalidad y en la conciencia, que pueden empeorar progresivamente hasta llevar al coma y a la muerte. Los mecanismos que llevan al deterioro cognitivo en la EH todavía no han sido bien descritos, pero se están estudiando en modelos animales.

La EH clínica se clasifica en 3 tipos: A, B y C (Ferenci et al., 2002).

La EH tipo A es aguda, y suele ocurrir en el contexto de un fallo hepático fulminante con necrosis masiva del hígado y una rápida progresión de los síntomas. Sus principales causas son las hepatitis virales agudas, la intoxicación por paracetamol o las reacciones idiosincrásicas a fármacos. Puede ser reversible o conducir a la muerte. El grado de mortalidad en la EH aguda es elevado y se debe frecuentemente a un aumento de la presión intracraneal como consecuencia de un edema cerebral.

La EH tipo B es crónica y se instaura por derivación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Se han descrito muchos casos entre la población japonesa

(Watanabe, 2000). Las derivaciones porto-sistémicas pueden ser espontáneas, como en el caso de la obstrucción de la vena porta extra-hepática (EHPVO). Es una causa común de hipertensión portal en niños (Yachha et al., 1996). Estos pacientes presentan flujo sanguíneo hepático reducido, concentraciones de amonio en sangre aumentadas, la relación glutamina/creatinina aumentada y en ocasiones anastomosis porta-cava espontánea.

La EH tipo C es crónica, y se asocia a cirrosis hepática e hipertensión portal. Es la más frecuente. En esta patología se generan derivaciones porto-sistémicas como consecuencia de enfermedades crónicas del hígado, generalmente cirrosis, con una estimable derivación de la sangre portal a la circulación sistémica (encefalopatía porto-sistémica). Se pueden producir episodios de EH clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de EH son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es eliminado. La derivación porto-sistémica también se realiza en los hospitales para tratar problemas como la hemorragia digestiva secundaria a ruptura de várices esófago-gástricas, una complicación muy frecuente y severa de los pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal.

La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se estima que 3 años después del primer episodio de encefalopatía clínica la mortalidad es del 60-80% (Bustamante et al., 1999). Las encefalopatías hepáticas de tipo B y C pueden ser clínicamente evidentes (encefalopatía hepática clínica) o no (encefalopatía hepática mínima). La encefalopatía hepática clínica se clasifica en tres formas según el modelo temporal de su aparición: ocasional, recurrente y persistente. La EH ocasional está caracterizada por un episodio de alteración neuropsiquiátrica debido a un factor desencadenante y generalmente no deja rastro en los pacientes en términos de alteraciones en los test psicométricos y del electroencefalograma. La EH recurrente se caracteriza por episodios múltiples de encefalopatía, alternados con periodos de normalidad de la situación neurológica del paciente. La EH persistente se caracteriza por alteraciones neuropsiquiátricas evidentes y continuas, aunque de duración variable en el tiempo y aparece sin una clara causa desencadenante.

2.1 Encefalopatía hepática mínima (EHM)

Pacientes sin síntomas evidentes de EH clínica pueden mostrar déficits cognitivos, como alteraciones de la percepción visuo-espacial, la atención y la concentración, y enlentecimiento psicomotor. Estos síntomas no son evidentes en un examen neurológico rutinario, pero se pueden desvelar cuando se realizan tests psicométricos adecuados. Este tipo de EH se denominaba encefalopatía hepática subclínica o latente, pero hoy en día se denomina encefalopatía hepática mínima (EHM) o cubierta (Amodio et al., 2004; Ferenci et al., 2002; Lockwood et al., 1993; Lockwood, 2000; Schomerus et al., 2001; Romero-Gómez et al., 2007). La EHM disminuye la calidad de vida de los pacientes (Slowik et al., 2001), aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico y predispone a sufrir EH clínica. Un 35-50% de los pacientes adultos con cirrosis hepática presentan EHM (Mínguez et al., 2006; Sharma et al., 2008).

El 41% de niños con EHPVO, a los que se les realizó una batería de 9 test neuropsicológicos para medir la memoria, entendimiento verbal, aprendizaje de nombres y cifras, etc., presentó EHM (Yadav et al., 2010). Se ha descrito que el 50% de los pacientes cirróticos con EHM desarrollan EH clínica en los siguientes 6 meses (Yen et al., 1990). Para poder diagnosticar la EHM se ha seleccionado como test de referencia la batería de pruebas psicométricas PHES (del inglés “*psychometric hepatic encephalopathy score*”) (Weissenborn et al., 2001) (ver apartado 2.2.3).

2.2 Alteraciones neurológicas en EH y EHM

2.2.1 Alteraciones neuropsiquiátricas

La encefalopatía hepática aguda se caracteriza por desórdenes neurológicos que progresan desde un estado mental alterado hasta el coma. En la mayoría de los casos la muerte se debe a aumento de la presión intracraneal por un abundante edema cerebral.

En cambio, la encefalopatía hepática crónica se desarrolla lentamente y puede presentar distintos grados. Los signos varían desde ligeros déficits de atención, cambios en la personalidad y enlentecimiento psicomotor en la EHM, alteraciones en los ciclos sueño-vigilia y cambios en el comportamiento, déficit de atención y síntomas extrapiramidales como hipomimia (falta de expresión facial) y bradiquinesia en grado I de EH, desorientación y comportamiento extraño en grado II, acabando finalmente en estupor y coma en grados III y IV (Weissenborn et al., 2005a). Se ha descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija, amnesia, cambios en el

temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (Sherlock et al., 1954). Un 50% de los pacientes cirróticos presentan alteraciones de los ciclos sueño-vigilia que se caracterizan por somnolencia durante el día, sobre todo a primeras horas, letargia y sopor, mientras que durante la noche la calidad del sueño está disminuida, duermen menos tiempo y el sueño está interrumpido por múltiples despertares (Córdoba et al., 1998). El rango de síntomas asociados a la EH clínica es muy amplio y no se ha establecido un síntoma o examen de laboratorio específico para su detección, por lo que su diagnóstico puede ser difícil. Se han definido 4 grados de gravedad para la EH clínica, según las manifestaciones neuropsicológicas. La Tabla 1 muestra los criterios de West–Haven para la clasificación del estado mental en pacientes con EH clínica.

Tabla 1. Criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en la Encefalopatía Hepática clínica

Grado	Sintomatología
0	Sin anormalidad detectada.
1	Leve falta de atención e incapacidad para mantenerla, euforia, ansiedad. Dificultad para realizar suma o sustracción de números sencillos.
2	Letargo, apatía, desorientación en tiempo y espacio. Cambios obvios de la personalidad.
3	Somnolencia a semiestupor, pero con respuesta a estímulos. Confusión. Desorientación importante.
4	Coma. Sin posibilidad de realizar pruebas de función mental.

(Modificado de Conn y Lieberthal, 1979).

2.2.2 Alteraciones motoras

Los pacientes con EH crónica presentan frecuentemente alteraciones en la actividad y coordinación motoras (Tabla 2).

Tabla 2. Alteraciones motoras en pacientes con encefalopatía hepática (clasificación West-Haven)

Grado	Sintomatología
0	Cambios sutiles en pruebas de conexión numérica o pruebas psicométricas.
1	Temblor, incoordinación, apraxia ¹ .
2	Asterixis ² , lenguaje lento o incomprensible, ataxia ³ .
3	Reflejos hipoactivos, nistagmo ⁴ , rigidez postural y clonus ⁵ .
4	Postura descerebrada y dilatación pupilar, reflejo oculocefálico ⁶ , ausencia de respuesta a estímulos en estadios avanzados.

(Modificado de Amodio et al., 2004).

1. *Trastorno de la ejecución del movimiento aprendido que no puede ser explicado como consecuencia de debilidad muscular, pérdida sensorial o falta de comprensión o atención a las órdenes verbales*
2. *Temblor de las manos en forma de aleteo*
3. *Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares*
4. *Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular, que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos.*
5. *Serie de contracciones rítmicas e involuntarias, de un músculo o grupo muscular por la extensión brusca y pasiva de sus tendones.*
6. *Se desencadena con los ojos abiertos y mediante giro de la cabeza con rapidez de un lado hacia el otro. El paciente comatoso cuyo tallo encefálico este intacto dirige los ojos en la dirección opuesta a aquella en que se gira la cabeza.*

El sistema motor en mamíferos se organiza en tres subsistemas: (i) vía corticoespinal, (ii) circuitos de los ganglios basales y (iii) cerebelo. En los pacientes con EH crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los 3 niveles de organización. Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un mal funcionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales como aquinesia, rigidez,...) se han descrito en pacientes con EH mínima y cirrosis hepática compensada (Krieger et al., 1996; Jover et al., 2003). Alteraciones de la coordinación motora (cerebelares) están presentes en pacientes con EH de grado 1 y 2, y alteraciones de la vía corticoespinal en pacientes desde grado 1 al 4 de EH (Krieger et al., 1996; Jones y Weissenborn, 1997; Weissenborn et al., 2005b). Jover et al. (2005) realizaron una serie de tests psicométricos para analizar el deterioro cognitivo, los signos extrapiramidales y la calidad de vida. De los 46 pacientes cirróticos estudiados, 22 manifestaron alteraciones motoras extrapiramidales y obtuvieron peores resultados en los tests psicométricos y de calidad de vida. En otro estudio, se comprobó que la presencia de alteraciones motoras

extrapiramidales predice el desarrollo de EH clínica y que los signos avanzan a medida que avanza la enfermedad reduciendo la calidad de vida (Compañy et al., 2010).

Estudios recientes llevados a cabo mediante el uso de tests psicométricos más sensibles muestran que los pacientes con EHM presentan alteraciones en la coordinación bimanual y visuomotora, moduladas principalmente por el cerebelo (Denniston et al., 2003; Felipo et al., 2012a).

2.2.3 Alteraciones cognitivas

Los primeros síntomas de las alteraciones cognitivas consisten en falta de concentración y de atención, así como en una disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con EH presentan una disminución continua en la atención acompañada de un descenso en el estado de alerta desde el grado II al grado III finalizando en coma (Weissenborn et al., 2005b). Incluso los pacientes que parecen no estar clínicamente afectados manifiestan distintos déficits de atención en tests psicométricos, indicando una anomalía en el funcionamiento de los tres subsistemas que colaboran en la atención: vigilia (capacidad para mantener el estado de alerta), orientación y funciones ejecutivas (como hacer planes, detección de errores, resolución de conflictos, etc.). En fases más avanzadas la falta de atención se hace más aguda de forma que cuando se le hace una pregunta a un paciente a menudo hay que repetir la cuestión y las repuestas son lentas y frecuentemente carentes de sentido (Weissenborn et al., 2005a).

Dos tests que miden la memoria a corto plazo son el de retención de dígitos, que cuantifica el número de dígitos ordenados de forma seriada que un paciente puede recordar de forma correcta tras haberlos escuchado o leído, y la lista de palabras de Luria (Christensen, 1984). En estos dos test los pacientes con EH obtienen peores puntuaciones que los controles (Weissenborn et al., 2005a). Para evaluar la memoria a largo plazo se utiliza el test de memoria de fotografías o dibujos. Se muestran al paciente varias imágenes duplicadas y desordenadas y este tiene que recordar donde estaban las imágenes duplicadas y emparejarlas. En este test también se han observado déficits en los pacientes con EH (Weissenborn et al., 2005a).

Los pacientes con EH presentan otros déficits cognitivos como alteraciones en la percepción visuo-espacial, que se manifiesta por ejemplo en la apraxia, incapacidad para reproducir figuras simples con bloques o figuras. También se producen déficits en pruebas de inteligencia, aprendizaje y memoria, así como de percepción motora y espacial (Puca et al., 1989), sin embargo, la capacidad verbal no está alterada. La

etiología de la cirrosis no se relaciona con los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnström et al., 1977).

Los pacientes con hepatitis crónica causada por el virus C también muestran alteraciones cognitivas en tareas que requieren atención, aprendizaje, velocidad psicomotora y flexibilidad mental, indicando que estos pacientes presentan alteraciones psicomotoras similares a los de los pacientes con otras enfermedades crónicas del hígado como la cirrosis por consumo crónico de alcohol (Hilsabeck et al., 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, en los pacientes con EHM las alteraciones cognitivas no son evidentes y sólo se pueden detectar realizando test psicométricos específicos. El término EHM se refiere a cambios sutiles en la función cognitiva que pueden ser observados en pacientes con cirrosis que no presentan evidencias clínicas de EH (Amodio et al., 2004). Para diagnosticar la presencia de EHM, se utiliza actualmente la batería denominada PHES (Weissenborn et al., 2001; Ferenci et al., 2002) que consta de 5 test psicométricos:

- Test de conexiones numéricas A: consiste en unir por orden los números (del 1 al 25) dispersos en un papel y lo más rápidamente posible, escogiendo siempre el camino más corto. Se mide el tiempo que el paciente tarda en realizar el test.
- Test de conexión numérica B: se debe realizar inmediatamente después del test de conexión numérica A. El paciente tiene una hoja con números del 1 al 13 y letras de la A hasta la L. La tarea consiste en conectar números y letras alternándolos, es decir unir el número 1 con la letra A, ésta con el número 2, con la letra B, así sucesivamente. Se mide el tiempo que el paciente necesita para terminar la tarea.
- Test de la clave de números: consiste en una hoja con cuadrados en los que se puede ver un número en la parte superior del cuadrado y un símbolo en la parte inferior. Cada símbolo corresponde a un número. El paciente tiene una hoja con cuadrados en los que ve los números en la parte superior y tiene que completarlos con el símbolo que le corresponda lo más rápidamente posible. Tiempo máximo disponible 90 segundos. Se cuantifica el número de cuadrados que el paciente es capaz de completar correctamente.
- Test de puntos seriados: consiste en 10 filas de círculos en los que el paciente tiene que poner un punto en el centro de cada círculo de la forma más precisa y

rápida posible. Cuando termine una fila deberá empezar con la siguiente. Se mide el tiempo que necesita para llevar a cabo la tarea.

- Test de trazado de líneas: consiste en trazar una línea continua entre dos líneas paralelas de trazado irregular. No debe tocar ni cruzar las líneas pintadas. No puede mover el papel ni levantar la punta del rotulador. Se mide el tiempo que necesita para realizar la tarea y los errores cometidos.

Los resultados obtenidos en los test de la batería PHES se ajustan en función de la edad y el nivel de formación de acuerdo con las tablas de normalidad de los sujetos control (www.redeh.org). Se considera que un paciente presenta EHM cuando en esta batería obtiene una puntuación igual o inferior a -4.

Las alteraciones en la capacidad de atención, procesamiento de la información, coordinación motora, etc, tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes (Dhiman y Chawla, 2009). La mayoría de los pacientes cirróticos con EHM tienen disminuida la capacidad de conducir vehículos (Schomerus et al., 2001; Bajaj et al., 2009). Los pacientes con EHM presentan alteraciones de la interacción social, del comportamiento emocional, del sueño, en el trabajo o en la realización de tareas domésticas (Groeneweg et al., 1998; Prasad et al., 2007). Además, se ha visto que los pacientes con EH presentan alteraciones en la memoria de trabajo (Ahluwalia et al., 2014) que parecen deberse a un mal funcionamiento de la corteza prefrontal (Liao et al., 2012).

2.3 Patogénesis de la encefalopatía hepática: sinergia entre inflamación periférica e hiperamonemia en la inducción de EH

La hiperamonemia conduce a alteraciones de la función cerebral, induciendo muchas de las alteraciones neurológicas asociadas a la encefalopatía hepática crónica (Felipo y Butterworth, 2002; Felipo, 2008).

La inflamación potencia las alteraciones neuropsicológicas inducidas por la hiperamonemia y el efecto sinérgico de hiperamonemia e inflamación es el principal responsable de las alteraciones neurológicas en EH. La hiperamonemia inducida en pacientes cirróticos deteriora el rendimiento en los tests neuropsicológicos durante el estado inflamatorio, pero no tras su resolución (Shawcross et al., 2004). Asimismo, mientras la presencia y severidad de EHM no dependen del grado del fallo hepático y de los niveles de amonio en sangre, pacientes con EHM presentan mayor concentración de

marcadores de inflamación (Shawcross et al., 2007; Montoliu et al., 2009). Los niveles de las interleucinas (ILs) proinflamatorias IL-6 e IL-18 están aumentados en pacientes con EHM comparados con pacientes sin EHM y la concentración en suero de estas interleucinas permite discernir entre pacientes cirróticos sin y con EHM (Montoliu et al., 2009). Esto sugiere que la inflamación relacionada con IL-6 e IL-18 parece contribuir a la EHM. Además, se ha estudiado el papel de la inflamación y de la hiperamonemia en la inducción de deterioro cognitivo en pacientes con diversas enfermedades hepáticas y dermatológicas, con distintos grados de hiperamonemia y/o inflamación (Felipo et al., 2012b). En todos los grupos de pacientes se encontró inflamación, pero el grado y el tipo de esta inflamación era distinto para los diversos tipos de pacientes, con diferentes aportaciones relativas de IL-6 y de IL-18. La hiperamonemia por sí sola no induce deterioro cognitivo según la evaluación realizada con la batería PHES. Los pacientes con queloides o cirrosis sin deterioro cognitivo muestran niveles de amonio no muy diferentes de los niveles de pacientes con queloides o cirrosis con deterioro cognitivo. La inflamación sola tampoco induce deterioro cognitivo. Los pacientes con NASH sin EHM muestran niveles muy altos de IL-18 y niveles moderados de IL-6 e hiperamonemia leve y no presentan déficits cognitivos. Un ligero aumento de amonio y un aumento de IL-6 inducen deterioro cognitivo leve en pacientes con NASH. Además, se ha visto que los pacientes cirróticos con niveles de IL-6 inferiores a 11 pg/ml no muestran EHM, mientras que los pacientes con niveles de IL-6 por encima de 11 pg/ml muestran EHM (Montoliu et al., 2009). Felipo et al. (2012b) concluyeron que en pacientes con enfermedades hepáticas (cirrosis, esteatohepatitis) el deterioro cognitivo puede aparecer antes de llegar a cirrosis, si los niveles de amonio y de inflamación son lo suficientemente elevados, y que niveles altos de inflamación e hiperamonemia son suficientes para inducir deterioro cognitivo leve incluso en ausencia de cirrosis.

3. El sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria

El sistema inmunitario es el sistema de defensa del organismo y responsable de proteger al mismo de agresiones tanto de origen externo como endógenas. Se compone de una red compleja e integrada de mediadores químicos y celulares, estructuras y procesos biológicos, desarrollados en el curso de la evolución para defender al organismo de cualquier forma de daño químico, traumático o infeccioso. Los dos principales tipos de

defensa se denominan respuesta innata y respuesta adaptativa. Ambas tienen el papel de identificar y suprimir el agente patógeno distinguiendo el tejido sano propio de lo ajeno, e interactúan para permitir la comunicación intercelular a través de receptores de superficie y mensajeros solubles (las citocinas). La respuesta innata estimula y modula la respuesta adaptativa, y la respuesta adaptativa a su vez potencia la actividad de la respuesta innata (Chaplin, 2010).

La inmunidad innata ha ido evolucionando hasta reconocer patrones conservados característicos de diversos patógenos y suele ser la primera línea de defensa. La inmunidad adaptativa ha evolucionado más recientemente y permite una respuesta inmunitaria más compleja, además de la llamada “memoria inmunológica” (Netea et al., 2016). La inmunidad adaptativa implica a los anticuerpos y requiere el reconocimiento de antígenos ajenos durante una sucesión de eventos definida como “presentación de antígenos”. La especificidad del antígeno permite la promoción de respuestas que se dirigen a patógenos específicos o a células infectadas por estos patógenos (Male et al., 2013).

3.1 Papel de los diferentes tipos de leucocitos en sangre

Los tipos celulares que cooperan en la inmunidad innata son los monocitos/macrófagos, los granulocitos polimorfonucleares, los linfocitos *natural killer* (NK), los mastocitos y las plaquetas. Los monocitos de circulación periférica, los macrófagos (que se diferencian a partir de los monocitos y se encuentran como células residentes en los tejidos) y los granulocitos polimorfo nucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) tienen el papel de llevar a cabo la fagocitosis de microbios extracelulares. Los linfocitos NK juegan un papel clave en la protección contra microorganismos intracelulares e inducen la muerte de las células infectadas por virus. Los mastocitos y plaquetas son esenciales en la inducción y el mantenimiento de la inflamación. Un grupo especializado de células denominado células presentadoras de antígeno (APC) actúa como conexión entre la respuesta innata y la adaptativa. Estas células se unen a los antígenos y los procesan para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T mediante receptores específicos (Male et al., 2013).

Las células responsables de la respuesta adaptativa son los linfocitos. Existen dos clases de linfocitos, los T y los B, y ambos poseen receptores altamente específicos para el antígeno (MacDonald et al., 1993). Los linfocitos se diferencian y maduran a partir de

células troncales en los órganos linfáticos primarios, y tras una fase de diferenciación independiente de antígeno, migran a la circulación sanguínea y llegan a los órganos linfáticos secundarios, donde finalmente actúan (Figura 6). En estos sitios tras el reconocimiento del antígeno pasan de ser linfocitos *naïve* a ser linfocitos efectores específicos (Chaplin, 2010). Los linfocitos T y B efectores se convertirán en los responsables de las respuestas inmunitarias celulares y humores, respectivamente.

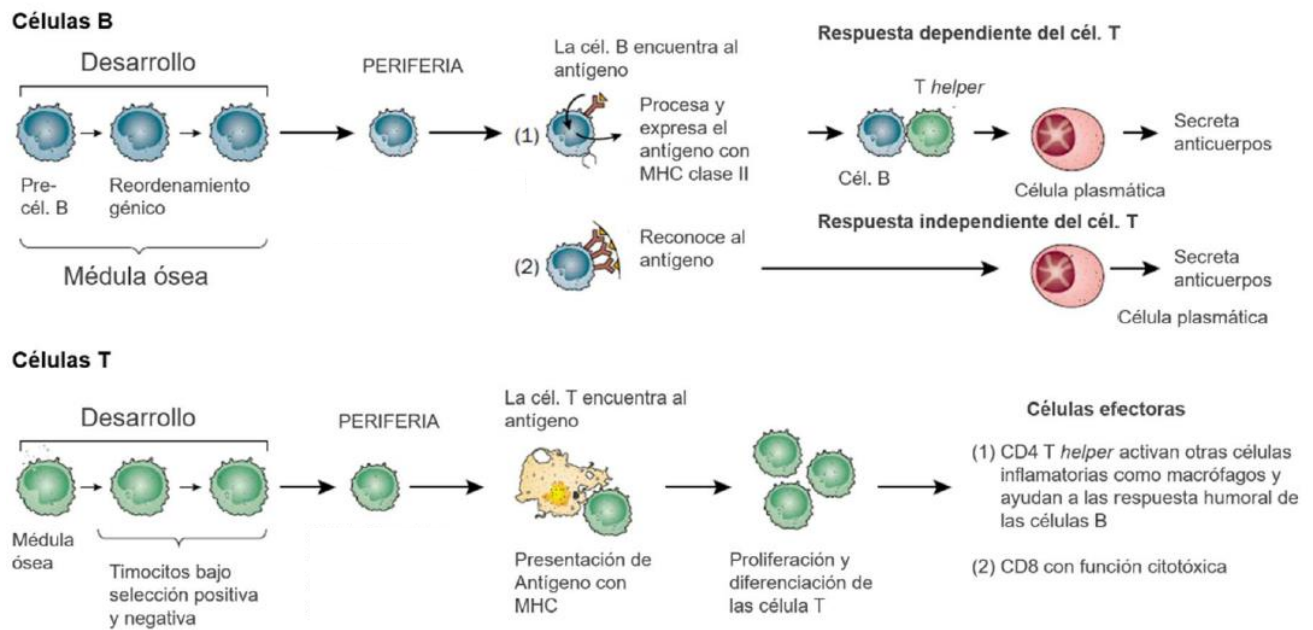


Figura 6. Esquema del desarrollo de los linfocitos B y linfocitos T. (Mangas-Losada, 2017a). Ver explicación en el texto.

3.1.1 Respuesta humoral: papel de los linfocitos B

Las principales funciones de los linfocitos B consisten en producir anticuerpos para hacer frente a toxinas, evitar la adhesión de microorganismos patógenos a las mucosas, activar el sistema del complemento y apoyar la actividad fagocitótica y la citotoxicidad. Durante la fase de desarrollo de los linfocitos B los anticuerpos actúan como receptores de membrana, para ser posteriormente secretados por las células B maduras. De esta forma pueden internalizar los antígenos y procesarlos para presentárselos a los linfocitos T mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Figura 6). Este tipo de respuesta se define “dependiente de células T”.

También se ha descrito una respuesta independiente de linfocitos T, que desarrollan los linfocitos B en el caso de que los antígenos presenten numerosos epítomos repetidos, que reconocen los receptores IgM de las células B induciendo directamente la secreción

de inmunoglobulinas (Igs). Este tipo de respuesta no implica generación de células de memoria, las cuales son responsables de la inmunidad a largo plazo (Figura 6).

Los linfocitos B inmaduros expresan IgM específicas para un antígeno, y tras la maduración, pueden expresar en su superficie también otros tipos de inmunoglobulinas, como IgD. Además, las células plasmáticas se diferencian a partir de los linfocitos B gracias a la estimulación por los linfocitos T CD4⁺, y más específicamente los linfocitos T foliculares (Tfh), y secretan grandes cantidades de anticuerpos, en particular IgG, IgA e IgE (Chaplin, 2010).

3.1.2 Respuesta celular: papel de los linfocitos T

Los linfocitos T presentan receptores de membrana asociados al complejo *cluster of differentiation* (CD) 3. El reconocimiento del antígeno por parte del receptor provoca una fosforilación de tirosinas en la cola citoplásmica del complejo CD3 que induce una transducción de señales hacia el núcleo que permite la activación de genes implicados en la proliferación de los linfocitos T. Este proceso se define como respuesta celular.

Los linfocitos T, tras originarse y madurar en el timo, se liberan al torrente sanguíneo. Estas células se consideran inmunológicamente *naïve* hasta que interactúan con una célula presentadora de antígenos (APC) produciendo una sinapsis inmunológica entre el MHC y el receptor de célula T (TCR). El estímulo entre MHC y TCR puede ser potenciado por moléculas coestimuladoras, como el receptor CD28. El reconocimiento antigénico induce la proliferación de las células T y su diferenciación a células efectoras. Tras la resolución de la infección o del daño la mayoría de los linfocitos T activados mueren por apoptosis. No obstante, un pequeño porcentaje de estas células efectoras sobrevive y mantiene una alta especificidad para el antígeno. Esto es lo que confiere eficiencia y rapidez a una segunda respuesta inmune tras la primera activación. Las células que mantiene una memoria inmunológica son los linfocitos T de memoria.

Los linfocitos T *naïve* y de memoria se distinguen, además de por su funcionalidad, por los marcadores que expresan en membrana. La L-selectina (CD62L) se expresa en células de memoria, *naïve* y centrales (Sallusto et al., 1999). El análisis de su expresión junto con CD44 permite la estimación de la frecuencia relativa de las células *naïve* (CD62L^{high}/CD44^{low}), de memoria efectoras (CD62L^{low}/CD44^{high}) y de memoria central (CD62L^{high}/CD44^{high}) (Caucheteux et al., 2013). Las células de memoria central presentan capacidad limitada para realizar funciones efectoras ya que son las que más se

han diferenciado, mientras que las de memoria efectora poseen una alta actividad citolítica y se activan rápidamente frente a un estímulo.

Los linfocitos de memoria central pueden infiltrar los nódulos linfáticos a través de las células endoteliales y muestran una capacidad migratoria parecida a la de las células *naïve*, mientras que las de memoria efectora poseen receptores que les permiten infiltrar tejidos no linfoides (Mackay et al., 1990).

Consecuentemente, los linfocitos T de memoria central y efectora facilitan respuestas complementarias ante una segunda infección; los de memoria efectora actúan a nivel local de forma inmediata, y los de memoria central dan rápidamente origen a un gran número de efectores desde los órganos linfoides secundarios (Berard y Tough, 2002).

Se identifican dos tipos principales de linfocitos T efectores: los *T helper* (Th) positivos para CD4 y los T citotóxicos positivos para CD8.

Los CD8⁺ citotóxicos son responsables de la actividad antiviral y antitumoral. Ejercen actividad citotóxica directamente sobre la célula diana, uniéndose a ella mediante receptores específicos que reconocen partes de antígenos de células patogénicas, induciendo la muerte celular por medio de una serie de enzimas, como las perforinas. (Chaplin, 2010).

La mayoría de linfocitos CD4 son CD28 positivos y requieren la participación del TCR para su activación, y la del CD28 como coestimulador. Sin embargo, hay una población de CD4⁺CD28⁻ que presenta actividad proinflamatoria sin la necesidad de la estimulación por una APC, y está implicada en procesos inflamatorios en diferentes patologías, como la aterosclerosis, infecciones virales crónicas o procesos autoinmunes (Broux et al., 2012a, Maly y Schirmer, 2015). En estados patológicos, la población de CD4⁺CD28⁻ indica senescencia celular prematura debido a una activación persistente, por lo que el aumento de esta población se puede considerar como un biomarcador de inmunosenescencia temprana (Vallejo et al., 2004). Esta población tiene características distintas al resto de los CD4 *helper* ya que presentan un fenotipo citotóxico, propio de los CD8. Las células CD4⁺CD28⁻ pueden liberar perforinas y granzimas B que pueden causar lisis de las células endoteliales y daño del tejido. También, pueden secretar grandes cantidades de TNF α y de interferón gamma (IFN γ) promoviendo un ambiente proinflamatorio (Dumitriu et al., 2009; Dumitriu, 2015; Maly y Schirmer 2015). Además, contrariamente a las CD4⁺CD28⁺, las CD4⁺CD28⁻ expresan en su membrana el (*C-X3-C motif*) receptor 1 (CX3CR1) (Broux et al., 2012b) por lo que mediante quimioatracción, migran a sitios con altos niveles de la quimioquina (*C-X3-C motif*) ligando 1

(CX3CL1). CX3CL1 también se denomina fractalkina, y es producido, entre otras, por células endoteliales (Jones et al., 2010). Se han encontrado infiltraciones de CD4⁺CD28⁻ en cerebro de pacientes con esclerosis múltiple (Broux et al., 2012b, Scholz et al., 1998) y en pacientes con enfermedad hepática crónica (Balzano et al., 2018). Esta infiltración estaría mediada por el CX3CR1/CX3CL1 y se amplificaría por la IL-15, que también amplifica las propiedades patogénicas de esta subpoblación (Broux et al., 2015).

Los linfocitos CD8⁺ que carecen de la molécula coestimuladora CD28 presentan baja capacidad proliferativa y se denominan CD8 reguladores. Poseen capacidad supresora ya que inhiben la activación y la proliferación de las células CD4⁺ mediante la acción de mediadores solubles, como la IL-10 y el TFGβ (Ceeraz et al., 2013, Arosa, 2002; Najafian et al., 2003; Feng et al., 2018). Múltiples estudios apoyan la idea de un papel regulador para las CD8⁺CD28⁻ en la supresión inmune de patologías como cáncer (Filaci et al., 2007) o enfermedades autoinmunes (Tulunay et al., 2008).

3.1.2.1 Diferenciación de los linfocitos T helper CD4

Los Th CD4⁺ se diferencian a diferentes tipos de linfocitos efectores en función de las citocinas a las que son expuestos, y se caracterizan por el patrón de citocinas que secretan y por la expresión de factores de transcripción específicos (Zhu et al., 2010) (Figura 7). Tienen un papel muy importante en el reconocimiento del antígeno y en la activación de otros tipos celulares que median la respuesta inmune, como los linfocitos B que controlan la respuesta humoral.

Los Th1 están implicados en la protección contra infecciones bacterianas y en el reconocimiento de agentes infecciosos intracelulares. Secretan interleucinas que favorecen la proliferación de otras células T, de las propias Th1 y las CD8 citotóxicas. También producen INFγ que activa macrófagos para eliminar patógenos intracelulares como micobacterias, hongos o protozoos (Zhu et al., 2010, Zhu y Paul, 2010). El factor de transcripción típico de esta población es el TBX21 (del inglés “*T-box transcription factor 21*”).

Los Th2 liberan IL-4, IL-5 e IL-13 favoreciendo la producción de anticuerpos y la proliferación de eosinófilos. El factor de transcripción característico es GATA3. Los Th2 responden a patógenos extracelulares, helmintos y alergias. La secreción de IL-4 da lugar a una cascada antiinflamatoria bloqueando la síntesis de citocinas proinflamatorias como la IL-1, TNFα, IL-6 y MIP (del inglés “*macrophage inflammatory protein*”) (Zhu y Paul, 2010).

Los Th17 juegan un papel clave en la defensa contra organismos patógenos, sobre todo bacterias extracelulares y hongos y en procesos inflamatorios en enfermedades autoinmunes (Noack y Miossec, 2014). Además, se han relacionado con el mantenimiento del tejido epitelial y afectaciones de la barrera intestinal (Blaschitz y Raffatellu, 2010). Secretan prevalentemente IL-17, la cual puede provocar inflamación masiva en tejidos debido a la gran distribución de sus receptores. Los receptores para la IL-17 se expresan en casi todos los tipos de células del hígado, incluyendo hepatocitos, células de Kupffer, células epiteliales biliares y endoteliales (Ge y You, 2008). La diferenciación a Th17 se asocia con el aumento de factores de transcripción como RORC (receptor huérfano C relacionado con el receptor de ácido retinoico) y STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3). Los Th17, mediante la producción de IL-17, pueden afectar la integridad de la barrera hemato-encefálica (BHE), induciendo un aumento de especies reactivas del oxígeno y una disminución de proteínas de unión entre las células endoteliales de la BHE (Huppert et al., 2010). También producen IL-21 e IL-22 (Korn et al., 2009, Rutz et al., 2013).

Los Th22 producen IL-22, además de TNF α e IL-13. La IL-22 puede ser producida por varios tipos de linfocitos T activados, incluyendo a los Th22, Th17, Th1 y algunas células no linfoides (Jia y Wu, 2014). La diferenciación al subtipo Th22 es inducida por IL-6 y TNF α , y potenciada por la IL-1 β , mientras que es inhibida por elevadas concentraciones de TGF β (Duhon et al., 2009). Se caracterizan por la expresión del factor de transcripción AHR (receptor de aril hidrocarburos). Como los Th17, los Th22 expresan el receptor de membrana CCR6 (del inglés “*C-C Motif Chemokine Receptor 6*”) (Schutyser et al., 2003). Su ligando, CCL20 (del inglés “*C-C Motif Chemokine Ligand 20*” o MIP-3), atrae a estos tipos celulares hacia epitelios inflamados, jugando un papel importante en la formación de tumores, en el daño dermatológico y en órganos digestivos como el intestino y en enfermedades inflamatorias (Paulissen et al., 2015).

Los Tfh o T foliculares sirven de apoyo a linfocitos B en la producción de anticuerpos en respuesta al reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T. También inducen y controlan cambios en la transposición y en la hiperpermutación somática en la formación de inmunoglobulinas (Ma et al., 2014). Esto ocurre principalmente en los centros germinales. Los Tfh secretan principalmente IL-21, cuya función es estimular la diferenciación de los linfocitos B a células formadoras de anticuerpos a través del receptor de la IL-21 (King et al., 2008). Expresan BCL6 (proteína 6 del linfoma de células B) como factor de transcripción característico.

Las Tregs o T reguladoras son una población de linfocitos efectores cuya función principal es la supresión de la actividad deletérea de otros linfocitos T. También participan en la prevención de enfermedades autoinmunes manteniendo la auto tolerancia (Kleinewietfeld y Hafler, 2014). Producen TGF β e IL-10 (Corthay, 2009). Expresan FoxP3 (del inglés “*forkhead box P3*”) como factor de transcripción característico. Además, las T reguladoras han sido relacionadas con el deterioro cognitivo en ciertas enfermedades que cursan con inflamación. Nguyen et al. (2012) estudiaron el papel de las T reguladoras en la disminución de la investigación social y el aumento de la inmovilidad en ratones con daño hepático. Demostraron que el agotamiento de las Tregs en la periferia empeoraba los comportamientos patológicos, mientras que la infusión de Tregs los mejoraba. En modelos de Alzheimer la amplificación de las células Tregs aumenta el número de células de microglía asociadas a la placa amiloide y restaura la función cognitiva, sugiriendo un papel beneficioso de las Tregs en esta enfermedad (Dansokho et al., 2016).

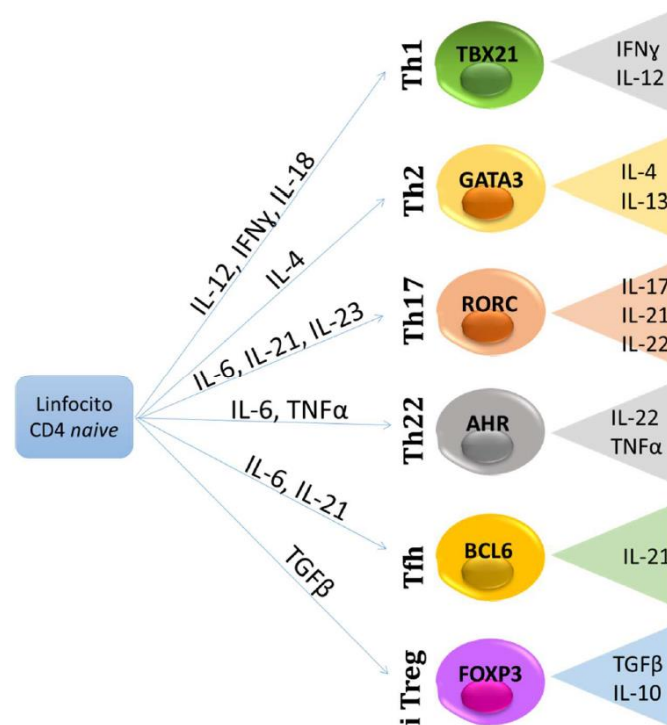


Figura 7. Subtipos de linfocitos CD4 efectores. Se muestran las interleucinas que inducen la diferenciación de cada subtipo celular, el factor de transcripción característico y las principales interleucinas que produce cada subpoblación (Mangas Losada, 2017a).

3.1.3 Papel de los monocitos y macrófagos

Los monocitos median la inflamación y la defensa innata. Los monocitos de rata se caracterizan por la expresión en su membrana de CD11b.

Durante el proceso inflamatorio los monocitos migran del torrente sanguíneo al tejido infectado según un gradiente de señales de quimioatracción establecido por factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas proinflamatorias. Tras haber alcanzado el tejido, se diferencian a macrófagos (Shi y Pamer, 2011). Los macrófagos pueden diferenciarse a macrófagos de tipo M1 proinflamatorios, o de tipo M2 antiinflamatorios según el microambiente (Boscá et al., 2015). La diferenciación al tipo M1 se realiza en respuesta a $\text{INF}\gamma$, LPS o $\text{TNF}\alpha$ e induce la expresión de enzimas como la iNOS (Óxido Nítrico Sintasa inducible) (Ghosh et al., 2015) y la cGKII (proteínquinasa dependiente de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) II) (Liao et al., 2015). La diferenciación al tipo M2 ocurre en presencia de IL-4, IL-13 o IL-10 y conlleva la inducción de enzimas que actúan durante la respuesta antiinflamatoria como la arginasa-1 (Hardbower et al., 2016).

Los macrófagos juegan un papel importante en la activación de los linfocitos T, que una vez activados pueden liberar citocinas, que activan más linfocitos T (Khera et al., 2012, Raveney et al., 2010). Esta actividad de los macrófagos comporta la producción de metabolitos tóxicos, como el óxido nítrico. Los macrófagos también tienen función fagocítica, y pueden actuar como APC presentando las proteínas fagocitadas a los linfocitos.

3.2 Mediadores de la inflamación: las citocinas

Las citocinas son proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia y son importantes mediadores de la inflamación periférica. Las interleucinas son una familia de polipéptidos que pertenece al grupo de las citocinas. Son producidas principalmente por leucocitos y son muy importantes en su activación, diferenciación o proliferación, secreción de anticuerpos, quimiotaxis y regulación de la inducción de otras citocinas. Las quimiocinas son citocinas que presentan capacidad de activar, atraer y dirigir diversas familias de leucocitos circulantes hacia los sitios dañados.

Las principales citocinas proinflamatorias son el $\text{TNF}\alpha$, las interleucinas IL-6, IL-1 β , IL-12 y IL-18 y el $\text{IFN}\gamma$. Otras citocinas relevantes en algunos procesos inflamatorios son la IL-17, IL-21, IL-23 y quimiocinas como el CCL2 (del inglés “*C-C Motif Chemokine Ligand 2*”) (o MCP-1 (del inglés “*monocyte chemotactic protein-1*”)) y el CCL20. Las principales citocinas antiinflamatorias son la IL-4, IL-13 y IL-10 y TGF β .

El TNF α es producido por monocitos/macrófagos, linfocitos T, neutrófilos, mastocitos y células endoteliales (Feldmann et al., 2001). En ratones los niveles séricos de TNF α aumentan 30 minutos después de un estímulo inflamatorio (Tracey et al., 1987). El bloqueo de la secreción de TNF α en respuesta a un estímulo inflamatorio, disminuye los niveles de IL-1 o IL-6 (Fong et al., 1989), desvelando el papel clave del TNF α en la iniciación o amplificación de la liberación de estas interleucinas. El TNF α coordina la respuesta de los niveles de citocinas tras un daño (Brennan et al., 1989) e induce diferentes quimiocinas y moléculas de adhesión (Doukas y Pober, 1990). El TNF α es responsable de la atracción de leucocitos inflamatorios al sitio dañado, causando la liberación de más TNF α . El TNF α también aumenta la proliferación de linfocitos T. No obstante, exposiciones excesivamente prolongadas al TNF α provocan inmunosupresión (Yokota et al., 1988, Gordon y Wofsy, 1990).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica producida por fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos (Gabay, 2006). Su señalización es clave en el desencadenamiento de la inflamación, tanto crónica, como aguda. Su liberación es inducida por la IL-1 y aumenta en respuesta a TNF α (Scheller et al., 2011).

La IL-1 es producida por macrófagos, monocitos y células dendríticas en respuesta al TNF α (Feldman et al., 2001). Existen 3 isoformas IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA (antagonista del receptor de IL-1). La IL-1 β está implicada en la patogénesis de diferentes enfermedades que cursan con inflamación como artritis reumatoide (Gattorno et al., 2008) o la enfermedad de Crohn (Kahle et al., 1992).

La IL-18 es una citocina proinflamatoria sintetizada por monocitos y macrófagos e induce la activación de NKs y de linfocitos T (Dinarello et al., 2013). También estimula la producción de IFN γ .

El IFN γ es otra citocina proinflamatoria producida por linfocitos T activados y por NKs e interviene en la activación de macrófagos. También presenta actividad antiviral, mediada por la respuesta de linfocitos Th1 (Luckheeram et al., 2012).

La IL-17 tiene un papel clave en inflamación, inmunidad y autoinmunidad y se ha relacionado con enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide o esclerosis múltiple (Lubberts et al., 2005, Gonzalez-García et al., 2009). Es proinflamatoria y actúa sobre células epiteliales, endoteliales, monocitos/macrófagos y linfocitos. Es producida principalmente por los Th17. Estimula la producción de IL-1 β , IL6, TNF α y prostaglandinas por macrófagos o células epiteliales (Chen y Zhou, 2015).

La IL-22 actúa de manera sinérgica con la IL-17 y el TNF α . Es producida por los Th22 y por los Th17 (Jia y Wu, 2014).

La IL-21 es una citocina pleiotrópica sintetizada por linfocitos T foliculares (Tfh) y Th17. Actúa sobre CD4, CD8, linfocitos B, macrófagos, monocitos o células dendríticas. Induce su propia expresión, la de IL-17 (Suto et al., 2008), la diferenciación a Th17 (Korn et al., 2007) e inhibe la diferenciación a Treg (Attridge et al., 2012). Activa los linfocitos B (Ozaki et al., 2004, Moens y Tangye, 2014), contribuye a la proliferación y actividad citotóxica de los CD8 (Liu et al., 2007), ayuda a la maduración funcional de las NK (Brady et al., 2010) y participa en la activación de los monocitos (Vallieres y Girard, 2013).

La IL-4 controla el proceso inflamatorio en cerebro, reduciendo la producción por parte de la microglía activada de COX-2 (ciclooxigenasa-2) y de mediadores proinflamatorios como TNF α e IL-1 β (Furlan et al., 2000, Ledebor et al., 2000). La IL-4 es secretada por linfocitos Th2, que también producen IL-13, antiinflamatoria.

La IL-10 es producida por monocitos antiinflamatorios y linfocitos B y T, principalmente por T reguladoras. Favorece la supervivencia de las células B, su proliferación y la producción de anticuerpos. Inhibe el efecto del LPS y los productos bacterianos inhibiendo la síntesis de citocinas proinflamatorias como el TNF α , IL-1 β (Opp et al., 1995), IL-12 (Aste-Amezaga et al., 1998) y el IFN γ (Varma et al., 2001).

La IL-15 se expresa de manera constitutiva en un gran número de tipos celulares como monocitos, macrófagos, células dendríticas, queratinocitos, fibroblastos y algunas células nerviosas. Tiene el papel de regular la homeostasis celular en la respuesta inmune innata y adaptativa (Lodolce et al., 2002, Todd et al., 2001).

El TGF β forma parte de la superfamilia de factores de crecimiento y controla la proliferación y diferenciación de muchos tipos celulares. Controla el balance entre Th17 y T reguladoras. A elevadas concentraciones, favorece la supresión del factor de transcripción RORC a través de un aumento de FOXP3, y con ello suprime la expresión de la IL-17, favoreciendo, por tanto, el desarrollo de las T reguladoras. A bajas concentraciones, junto con IL-6 e IL-21, favorece la expresión de la IL-17 y el receptor de IL-23, promoviendo la diferenciación a Th17 y la supresión de las T reguladoras (Zhou et al., 2008).

El CCL20 es una quimiocina que atrae linfocitos. Se induce por productos microbianos como el LPS o por citocinas proinflamatorias como el TNF α y el IFN γ , mientras que es inhibido por la IL-10. El CCL20 se expresa en varios tejidos y células como linfocitos

de la periferia, nódulos linfáticos, células endoteliales e hígado. Se une al receptor CCR6 y provoca atracción química dependiente de gradiente de las células CCR6 positivas (como las Th17 y las Th22) hacía el tejido inflamado. A pesar de que CCL20 y CCR6 están implicadas en patologías hepáticas y carcinomas hepatocelulares (Affò et al., 2014), el papel del CCL20 en el daño hepático crónico no ha sido investigado. El eje CCL20-CCR6 es un componente esencial de la defensa inmune innata contra la meningitis neumocócica, mediante el reclutamiento de granulocitos (Klein et al., 2014). CCL2 es una pequeña quimiocina que recluta monocitos, células T de memoria y células dendríticas a los sitios de inflamación producida por lesión tisular o infección. CCL2 está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades caracterizadas por infiltrados monocíticos, como la psoriasis, la artritis reumatoide y la aterosclerosis (Antonelli et al., 2009; Xia y Sui, 2009). CCL2 también promueve la inflamación local y la infiltración de macrófagos en el hígado en lesiones crónicas (Baeck et al., 2012). La CX3CL1, o fractalkina, es una quimocina sintetizada por las células endoteliales como proteína de membrana con un dominio N-terminal que se libera y se secreta. Su receptor específico, CX3CR1, se expresa en monocitos y linfocitos. La fractalkina unida a membrana funciona como una molécula de adhesión para las células que presentan su receptor y la parte secretada tiene una función de quimioatracción. La función principal de esta citocina es la regulación de la adhesión de leucocitos a células endoteliales, pudiendo mediar la infiltración por ejemplo de los CD4 autorreactivos, proceso amplificado por la IL-15. La producción de la fractalkina aumenta en presencia de TNF α , IL-1, LPS e INF γ (Imaizumi et al., 2004).

3.3 Neuroinflamación

La neuroinflamación se define como una respuesta inflamatoria dentro del cerebro o la médula espinal. Esta inflamación está mediada por la producción de citocinas, quimiocinas, especies reactivas del oxígeno y mensajeros secundarios. Estos mediadores son producidos por la glía residente del SNC (sistema nervioso central) (microglía y astrocitos), células endoteliales y células inmunes del sistema periférico (DiSabato et al., 2016). Puede iniciarse en respuesta a una variedad de señales, incluyendo infecciones, lesiones cerebrales traumáticas, metabolitos tóxicos o autoinmunidad.

La barrera hematoencefálica (BHE), protege el cerebro de influencias externas y lo aísla en gran medida del sistema inmune. Durante una infección, la mayoría de las citocinas no pueden cruzar la BHE directamente, aunque se han descrito sistemas de transporte saturables desde la sangre hasta el SNC para IL-1 α , IL-1 β , el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), IL-6 y TNF α (Banks et al., 1995; Pan et al., 2011). El sistema inmune puede enviar señales al cerebro durante los procesos inflamatorios que pueden inducir neuroinflamación. La respuesta inmunitaria en el SNC se debe en gran parte a la activación de la microglía, descrita como los macrófagos residentes del SNC (Bentivoglio et al., 2011).

La neuroinflamación altera el correcto funcionamiento del cerebro siendo uno de los principales desencadenantes de déficits cognitivos en numerosas enfermedades crónicas (como cirrosis o diabetes), mentales (como la esquizofrenia) y neurodegenerativas (como el Alzheimer) así como de alteraciones cognitivas post-operatorias y asociadas al envejecimiento (Bilbo et al., 2012; Cherniack, 2012; Boyer et al., 2013; Hovens et al., 2014; Takeda et al., 2014; Tenorio-Laranga et al., 2015; Montoliu et al., 2015; Cabrera-Pastor et al., 2019).

3.3.1 Microglía

Las células gliales, células no excitables del SNC, son una población altamente heterogénea, que regula muchas funciones cerebrales.

La microglía, las células arquetípicas de la inmunidad innata del SNC (Ransohoff y Cardona, 2010), son una población celular mieloide, derivada del saco vitelino durante una estrecha ventana de tiempo antes de la vascularización o hematopoyesis definitiva en el embrión (Ginhoux et al., 2010). Una vez establecida en el parénquima del SNC, la microglía se mantiene por la proliferación de progenitores residentes, independientemente de las células sanguíneas (Ajami et al., 2007).

En condiciones fisiológicas, la microglía presenta una morfología muy ramificada que se denomina “estado de reposo”. La microglía en reposo presenta un pequeño cuerpo celular y procesos finos muy elaborados, que envían múltiples ramas que reconocen continuamente su microambiente local (Nimmerjahn et al., 2005).

El daño neuronal focal induce un movimiento rápido de muchos procesos microgliales hacia el sitio de la lesión, y en menos de una hora la lesión puede estar completamente rodeada por estos procesos. Los procesos microgliales actúan como un sistema de escáner muy sofisticado y rápido, que puede, a través de receptores de la membrana

plasmática de la microglía, detectar inmediatamente la lesión e iniciar el proceso de respuesta activa de la microglía.

Cuando las células microgliales detectan un insulto cerebral, sufren una transformación gradual del estado reposo con morfología ramificada a una forma activada y ameboide (Hanisch y Kettenmann, 2007). Este proceso se denomina "activación microglial" y se produce a través de varios pasos. Durante la primera fase las microglías en reposo retraen sus procesos, que disminuyen su número y se vuelven mucho más gruesos, aumentan el tamaño de sus cuerpos celulares, cambian la expresión de varias enzimas y receptores y comienzan a producir moléculas de respuesta inmune. Algunas células microgliales regresan a una modalidad proliferativa y las células microgliales alrededor del sitio de la lesión comienzan a multiplicarse. Las células microgliales se vuelven móviles y mediante movimientos de tipo ameboide se reúnen alrededor de los sitios del daño. Si el insulto persiste y las células del SNC comienzan a morir, las células microgliales sufren una mayor transformación y se convierten en fagocitos. El proceso de activación es gradual y lo más probable es que existan muchos sub-estados en el camino desde la microglía en reposo hasta la microglía fagocítica. Además, las células microgliales activadas pueden mostrar propiedades bastante heterogéneas en diferentes tipos de patologías y en diferentes partes del cerebro (Hanisch y Kettenmann, 2007).

3.3.2 Astrocitos

Otro tipo de célula glial que participa en la neuroinflamación son los astrocitos. Los astrocitos (literalmente "células parecidas a las estrellas") son las células gliales más numerosas y diversas del SNC presentando propiedades fisiológicas muy diversas según su localización en el cerebro (Matyash y Kettenmann, 2010).

Los astrocitos presentan una morfología muy heterogénea. Algunos tienen una apariencia estelar, con varios procesos primarios originados en el soma, aunque existen muchos más perfiles morfológicos. Un rasgo arquetípico de los astrocitos es su expresión de filamentos intermedios, que forman el citoesqueleto. Los principales son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la vimentina. La expresión de GFAP se utiliza comúnmente como un marcador específico para la identificación de astrocitos.

Los astrocitos desempeñan muchas funciones; modulación del microambiente cerebral (Chouard y Gray, 2010), de la microarquitectura del parénquima cerebral (Nave, 2010), y de la homeostasis del cerebro, almacenamiento y liberación de sustratos energéticos, control del desarrollo de células neurales (Chouard y Gray, 2010), de la sinaptogénesis

y del mantenimiento sináptico (Eroglu y Barres, 2010). También contribuyen a la defensa del cerebro frente a diversos tipos de insultos (Smith, 2010).

Insultos cerebrales de diversas etiologías desencadenan una respuesta de defensa astrogliar denominada astrogliosis reactiva, que es esencial tanto para limitar las áreas de daño (por formación de cicatrices) como para la remodelación post-insulto y recuperación de la función neural.

La activación de los astrocitos se caracteriza por cambios morfológicos y moleculares, como la regulación positiva de las proteínas de los filamentos intermedios, GFAP y vimentina, y una hipertrofia característica del cuerpo celular y de sus procesos. Estos cambios se han observado tras muchos tipos de lesiones, incluyendo traumas mecánicos, isquemia/hipoxia, inflamación, neurodegeneración y prácticamente en todas las áreas del SNC (Eng et al., 2000, Sofroniew y Vinters, 2010; Middeldorp y Hol, 2011).

Las células astrogliales determinan en gran medida la progresión y el resultado de las enfermedades neurológicas representando por tanto una posible diana terapéutica en enfermedades caracterizadas por procesos neuroinflamatorios.

En condiciones de neuroinflamación, tanto los astrocitos como la microglía pueden liberar citocinas como IL-1 β , IL-6 y TNF α (Vezzani et al.; 2008).

3.3.3 Papel de la inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación

La inflamación periférica puede conducir a alteraciones cognitivas y motoras en diferentes situaciones patológicas como la artritis reumatoide, diabetes, cirrosis hepática, o tras cirugías agresivas (Montoliu et al., 2015).

Los mecanismos involucrados en esta relación entre inflamación periférica y SNC aún no se conocen completamente. Existen mecanismos que permiten la comunicación del sistema inmune periférico con el cerebro, entre ellos:

- infiltración de células de la sangre en cerebro (Ransohoff et al., 2003);
- estimulación por parte de las citocinas periféricas de sus receptores en las células endoteliales, induciendo la liberación de factores inflamatorios en el cerebro (Gautron et al., 2002; Rummel et al., 2006).
- señalización por fibras nerviosas aferentes (nervio vago) (Hosoi et al., 2002)

El mecanismo de inducción de neuroinflamación por señalización por fibras nerviosas aferentes (Hosoi et al., 2002) está poco estudiado. Se ha propuesto que el nervio vago

aferente es un componente importante para transmitir señales inmunes periféricas al cerebro. Ek et al. (1998) demostraron que los somas y/o fibras del nervio vago expresan receptores de IL-1 y prostaglandina (PG) E₂ y que la IL-1 β circulante estimula la actividad sensorial vagal. La administración intravenosa de IL-1 activa los circuitos neuronales autónomos centrales que se originan en el núcleo del tracto solitario. Se ha propuesto que las fibras nerviosas aferentes vagales que originan en la periferia pueden controlar los niveles periféricos de IL-1 (Ek et al., 1998).

Uno de los mecanismos más estudiados de comunicación entre inflamación periférica y cerebro es la infiltración directa de células sanguíneas en cerebro. Existen varias vías para la entrada de leucocitos en el SNC (Ransohoff et al., 2003). Este mecanismo se explicará en detalle en el apartado 3.3.3.1.

Otra conexión entre sistema inmune y cerebro es la estimulación por parte de las citocinas periféricas de sus receptores en las células endoteliales cerebrales, lo que induce producción in situ de factores inflamatorios. En modelos animales la administración periférica de LPS induce inflamación y activa STAT3 en zonas de la interfaz entre el cerebro y la sangre o el líquido cefalorraquídeo (como la hipófisis, la capa endotelial, las meninges, la glía limitante, los órganos circunventriculares y el parénquima nervioso circundante) y en astrocitos (Gautron et al., 2002). Rummel et al. (2006) demostraron que la IL-6 sanguínea activa receptores en células endoteliales conduciendo a la activación de STAT3 y a la inducción de la COX-2 y el aumento de PGE₂ (inflamatoria) en todo el cerebro. El uso de un anticuerpo anti-IL6 previene esta activación.

3.3.3.1 Infiltración de células del sistema inmune periférico en el SNC

El sistema inmune periférico puede inducir neuroinflamación a través la infiltración de células periféricas. En la periferia las células T promueven respuestas inmunes mediante la interacción con células presentadoras de antígenos (como por ejemplo células dendríticas). Sin embargo, ninguna célula en el parénquima cerebral puede actuar como las células dendríticas, escaparse del SNC, migrar a un vaso linfático local y empezar una respuesta inmune como sucede durante las respuestas inmunitarias adaptativas en otras partes del cuerpo (Louveau et al., 2015; Goldmann et al., 2006; Ransohoff y Engelhardt, 2012). Por tanto, las células T se activan en la periferia y migran hacia el SNC para hacer frente al insulto (Ransohoff y Brown, 2012).

Identificar los mecanismos por los cuales las células del sistema inmune periférico se infiltran en el SNC podría facilitar nuevas estrategias para modular la respuesta inmune patológica y mejorar los mecanismos protectores en enfermedades asociadas a neuroinflamación.

Los leucocitos pueden entrar en el SNC por distintas vías (Ransohoff et al., 2003). La más conocida es desde la sangre en el espacio perivascular a través de la BHE. La BHE comprende los capilares y las vénulas post-capilares, que son los principales sitios de extravasación de leucocitos (Bechmann et al., 2007; Engelhardt y Ransohoff, 2005). La función de barrera de la BHE es ejercida por células endoteliales cerebrales altamente especializadas, que carecen de vesículas pinocíticas y fenestras pero disponen de uniones intercelulares ceñidas (*tight-junction*). Por lo tanto, el movimiento transcelular y paracelular de las moléculas y las células está limitado. Las células endoteliales microvasculares cerebrales están unidas a una membrana basal (Figura 8) y una matriz extracelular, formada por colágenos, elastina, fibrilina, laminina y fibronectina (Hayashi et al., 1997, Hurwitz et al., 1993).

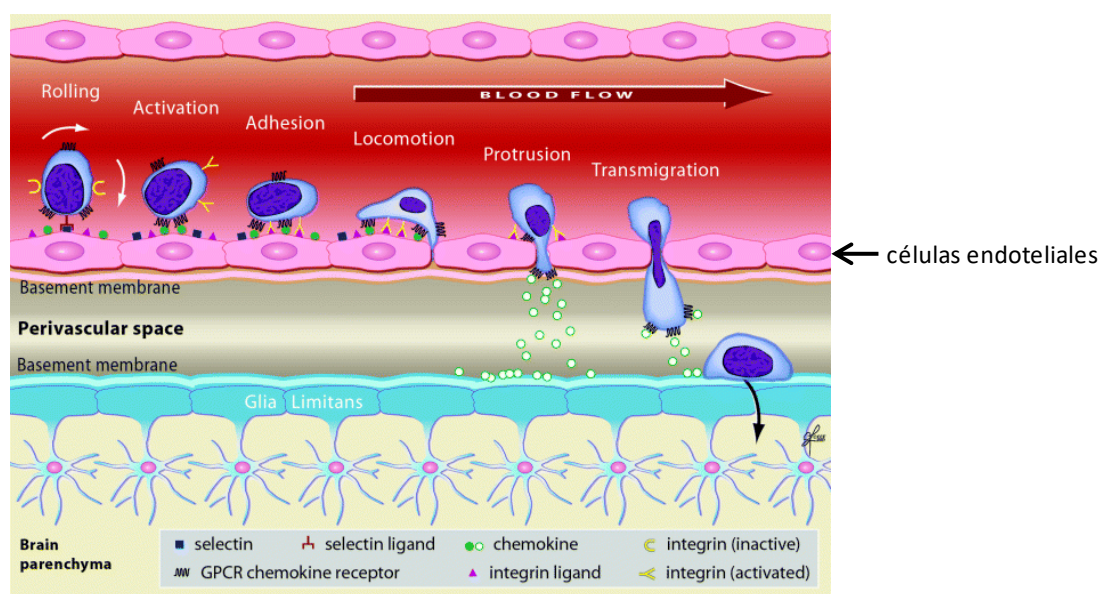


Figura 8. Esquema del proceso de infiltración de leucocitos a través de la BHE. Interacciones leucocito-célula endotelial en varios pasos en la barrera hematoencefálica y límites anatómicos entre la sangre y el parénquima cerebral (Man, 2007).

Los leucocitos activados en la periferia se unen a las células endoteliales gracias al reconocimiento de las selectinas por sus ligandos. La unión de los receptores de quimiocinas leucocitarias con las quimiocinas del lumen inicia la señalización (activación), lo que lleva a la aglomeración y al cambio conformacional en las

integrinas leucocitarias, originando una unión de alta afinidad con sus ligandos. Este contacto tiene lugar en el endotelio y media la adhesión de los leucocitos. Tras la adhesión, muchos leucocitos se mueven a través de la superficie endotelial hasta alcanzar uniones inter-endoteliales (Figura 8). Los leucocitos entonces emiten protuberancias por medio de la unión interendotelial, en busca de quimiocinas abluminales como CXCL1, CCL2, CCL5 y CXCL12, que funcionarán como señales de guía para la extravasación. La transmigración se verifica en respuesta a estas quimiocinas abluminales. Las células extravasantes se encuentran en el espacio perivascular, entre la membrana basal endotelial y la membrana basal de la *glia limitans* (Figura 8). La entrada en el parénquima cerebral propio implica atravesar la *glia limitans* y su membrana basal asociada, y requiere la acción de las metaloproteasas de la matriz. (Man et al., 2007).

Las meninges constituyen otra vía de entrada y acumulación de leucocitos en el SNC durante el proceso inflamatorio. Las meninges son una serie de membranas que envuelven el cerebro y la médula espinal, y actúan como un canal para la circulación del líquido cefalorraquídeo. La membrana más externa es la dura, que envuelve el SNC y se une al cráneo y la columna vertebral. Las leptomeninges, que envuelven todo el SNC, son la aracnoide y la pía madre y están separadas por el espacio subaracnoideo (Figura 9). Los grandes vasos sanguíneos que transectan las leptomeninges se encuentran dentro de la pía madre, que está bordeada por la *glia limitans*. Las células de la pía madre continúan siguiendo el curso de las arterias intra-cerebrales pero poco a poco se hacen menos densas conforme las arterias penetran en el parénquima del SNC (Zhang et al., 1990).

El endotelio sanguíneo que transecta el espacio subaracnoideo (la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo) es una importante vía de acceso de leucocitos a las meninges. En condiciones fisiológicas, el espacio subaracnoideo constituye una vía para que los linfocitos de inmuno-vigilancia examinen el SNC (Engelhardt y Ransohoff, 2012). La infiltración de linfocitos en las meninges juega un papel importante en la patogénesis de la esclerosis múltiple (Pikor et al., 2016) y del principal modelo experimental de esta enfermedad, la encefalitis autoinmune experimental (Columba-Cabezas et al., 2006). Los estudios que analizan la cinética de la infiltración meníngea en encefalitis autoinmune experimental muestran una afluencia de células inmunitarias antes del inicio de la fase clínica (Walker-Caulfield et al., 2015). Además, se ha demostrado que

células T reactivas contra la proteína básica de mielina, un componente de la mielina, atraviesan la barrera hematoencefálica en el espacio subaracnoideo, mostrando el antígeno específico para obtener acceso al parénquima e iniciar la respuesta típica de la fase clínica de la enfermedad (Bartholomaeus et al., 2009). Distintas poblaciones de leucocitos migran diferencialmente al cerebro en sitios selectivos, dependiendo de la expresión relativa de moléculas de adhesión durante las condiciones neuroinflamatorias (Engelhardt y Ransohoff, 2012).

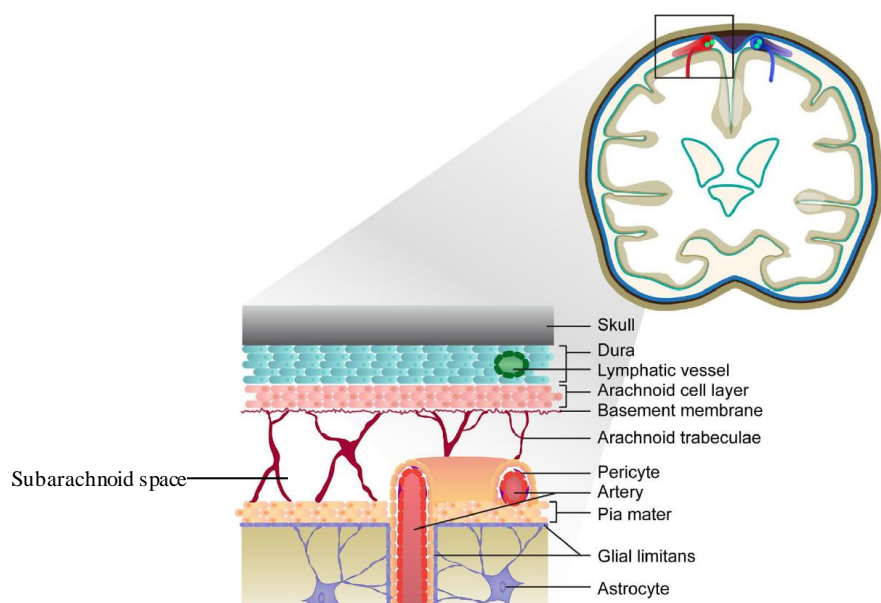


Figura 9. Representación de las meninges. (Balzano, 2017). Ver explicación en el texto.

El plexo coroideo constituye otro punto de acceso para los leucocitos al SNC. Las células endoteliales del plexo coroideo presentan una estructura fenestrada, que puede fácilmente ser cruzada por células inmunes. Sin embargo, para que las células inmunes lleguen al líquido cefalorraquídeo, también deben cruzar una capa de células epiteliales del plexo coroideo conectadas por *tight junction*. (Figura 10).

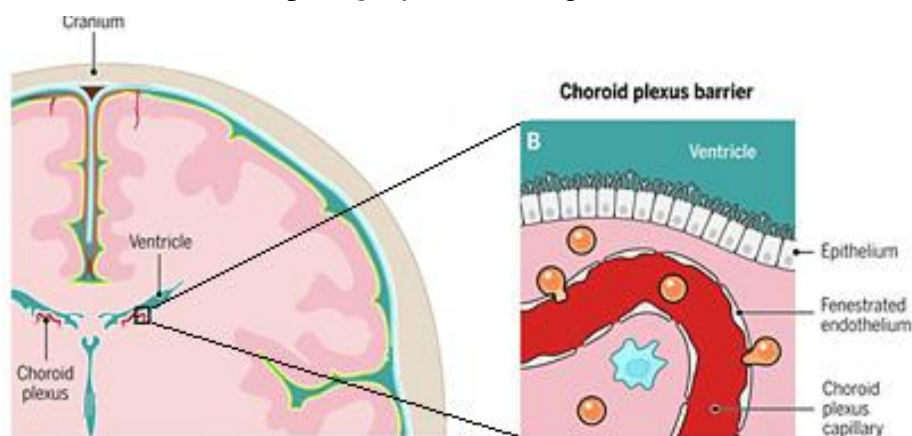


Figura 10. Estructura del plexo-coroideo. (Modificado de Kipnis, 2016).

3.4 Alteraciones en el sistema inmunitario asociadas al daño hepático

Los apartados anteriores muestran que la inflamación periférica puede inducir neuroinflamación que altera la función cerebral y puede conducir al deterioro cognitivo y motor. Las enfermedades hepáticas alteran el sistema inmune y conducen a inflamación periférica. En este apartado resumimos brevemente estas alteraciones.

El hígado es un órgano inmunológicamente complejo, responsable de la producción de proteínas de fase aguda, componentes del complemento, citocinas y quimiocinas, y contiene diversas poblaciones de células inmunes residentes (Crispe, 2009, Nemeth et al., 2009, O'Farrelly, 1999).

En condiciones normales, el hígado está constantemente expuesto a productos de bacterias y comensales (residentes fisiológicamente en el intestino) con potencial inflamatorio. En el hígado sano, el cambio constante de la actividad metabólica combinada con la exposición regular a productos microbianos, produce una inflamación persistente y regulada. La estimulación a una actividad adicional ocurre solo cuando se requiere que el hígado se libere de patógenos, células malignas o productos tóxicos. Si no se eliminan estos estímulos nocivos y no se resuelve la inflamación, se pueden producir infección crónica, autoinmunidad o crecimiento tumoral. Esto está asociado con una inflamación patológica crónica y la alteración del tejido, pudiendo progresar a fibrosis, cirrosis e insuficiencia hepática (Robinson et al, 2016).

La inmunidad innata juega un papel importante en la activación y amplificación de la inflamación hepática en NAFLD y NASH. Los productos bacterianos nocivos pueden llegar al hígado como resultado de una alteración de la integridad de la barrera intestinal inducida por componentes dietéticos o por disbiosis microbiana, factores clave en la inducción de la lesión hepática en NAFLD y NASH (Arrese et al., 2016).

En el hígado sano los *pattern recognition receptors* (PRR) expresados por hepatocitos y células de Kupffer (KC), reconocen patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) y/o a daños (DAMP), que abundan en la sangre que llega desde la vena porta. Tras la unión, MAMP y DAMP son fagocitados y degradados por hepatocitos y KC, sin que se produzcan mediadores inflamatorios (Robinson et al, 2016). El reconocimiento por las KC de señales enviadas por hepatocitos dañados o apoptóticos, o de productos bacterianos, determina la activación de estas células y una robusta respuesta proinflamatoria. En condiciones de daño hepático, las KC activadas secretan

mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas proinflamatorias, como el $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 o IL-12, ion súperóxido, óxido nítrico, eicosanoides, quimiocinas y enzimas proteolíticas, produciendo un aumento de la citotoxicidad (Neuman et al., 2015).

Durante el desarrollo de la enfermedad hepática el daño de los hepatocitos conduce a una inducción temprana de algunas quimiocinas, en particular de CCL2, que contribuye al reclutamiento de macrófagos, y de IL-8, que recluta leucocitos y neutrófilos al hígado (Mandrekar et al., 2011). Las KC y los macrófagos reclutados en el hígado son activados por la endotoxina bacteriana (lipopolisacárido-LPS) a través del receptor TLR4 (receptor Toll-like) (Uesugi et al., 2001, Szabo, 2015).

ASH y NASH se caracterizan por activación de macrófagos proinflamatorios M1, derivados de monocitos sanguíneos.

En la cirrosis se produce linfopenia, especialmente de linfocitos T *helper*, debida a un secuestro esplénico de los mismos (Lario et al. 2013), que puede desencadenar autoinmunidad debido a la expansión clonal de linfocitos T autorreactivos (Le Campion et al., 2009). También se ha descrito disminución de los niveles de Th *naïve* en enfermedades hepáticas de diferentes etiologías (Yonkers et al., 2011, Aseni et al., 1988, Aoki et al., 1993).

En pacientes cirróticos también se detectan niveles alterados de interleucinas en suero, que han sido propuestas como posibles dianas terapéuticas (Hammerich y Tacke, 2014). Algunas de estas ILs contribuyen a la regulación de la fibrogénesis. La IL-17 promueve la fibrogénesis hepática a través de la activación de las células estrelladas hepáticas y promueve el desarrollo de cáncer de hígado a través del reclutamiento de células mieloides supresoras (Lan et al., 2009). Por otra parte, la IL-22 protege del desarrollo de fibrosis y esteatohepatitis (Yang et al., 2010) aunque participa en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Jiang et al., 2011). La IL-10 tiene función protectora en condiciones de daño hepático crónico y fibrogénesis (Thompson et al., 1998). La IL-6 tiene un papel controvertido, ejerciendo por un lado un papel crítico en la fase aguda de daño hepático (Yeh y Chen, 2010), y protegiendo por otro durante la progresión de la fibrosis.

Mangas-Losada et al. (2017b) describieron que la aparición de EHM en pacientes con cirrosis hepática está asociada con cambios cualitativos específicos en la inflamación periférica y en el inmunofenotipo. Estas incluyen: 1) aumento de activación de todos los subtipos de linfocitos T CD4^+ ; 2) aumento de los niveles de los linfocitos T autorreactivos $\text{CD4}^+\text{CD28}^-$, que se asocia a un aumento de los niveles de CX3CL1 e IL-

15, que podrían promover su infiltración en cerebro; 3) aumento de la diferenciación de los linfocitos $CD4^+$ hacia los subtipos Th22 y Tfh, que podrían favorecer la formación de órganos linfoides terciarios en cerebro; 4) aumento de la activación de los linfocitos B y de las IgG séricas. También propusieron mecanismos por los que estas alteraciones en la inflamación periférica podrían contribuir a la aparición de las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM: 1) infiltración en cerebro de células $CD4^+CD28^-$ con generación de neuroinflamación y alteraciones neurológicas; 2) activación por parte de las citocinas periféricas ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$) de sus receptores en las células endoteliales, induciendo transducción de señales inflamatorias en cerebro, neuroinflamación y alteraciones neurológicas; 3) infiltración de células Tfh y formación de órganos linfoides terciarios con centros germinales formados por linfocitos B, conduciendo a alteraciones neurológicas (Figura 11). Algunas de estas hipótesis fueron estudiadas por Balzano et al. (2018) como se comenta en el apartado 4.3.

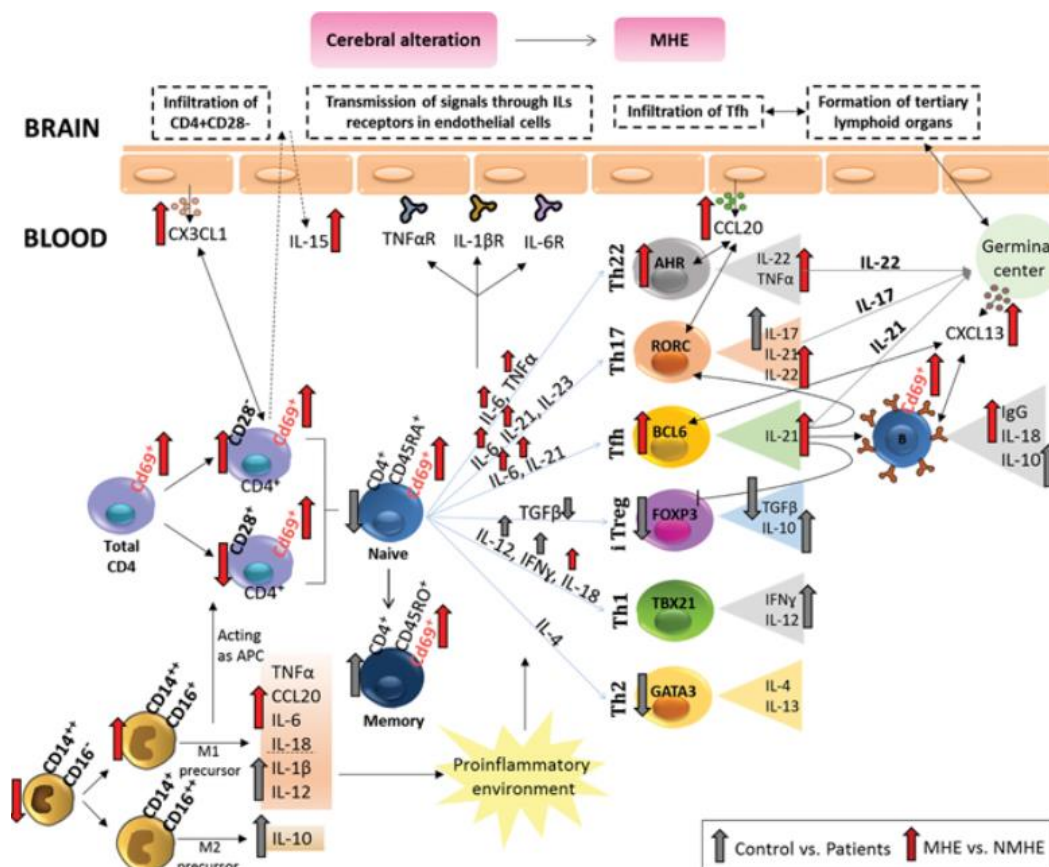


Figura 11. Esquema que resume los cambios en el inmunofenotipo asociados a la aparición de EHM en pacientes con cirrosis hepática e hipótesis sobre cómo esto puede afectar el cerebro y conducir a alteraciones neurológicas. (Mangas Losada et al., 2017b).

4. Mecanismos que contribuyen al deterioro cognitivo y motor en EHM. Papel de la neuroinflamación

4.1 Función cognitiva: memoria y aprendizaje

Diferentes tipos de aprendizaje y memoria están modulados por distintas redes neuronales (Kandel, 2000).

El hipocampo tiene un papel clave en la modulación del aprendizaje y de la memoria espacial. O'Keefe y Nadel en 1978 propusieron que en la memoria y aprendizaje participan dos sistemas independientes. El primero es el sistema cartográfico, dependiente de hipocampo, cuya característica fundamental es la capacidad de reajustarse de forma continua a los cambios en las pistas visuales del entorno conforme el individuo se mueve hacia el objetivo. El segundo es el sistema táxico, independiente del hipocampo y que implica una asociación entre estímulo y respuesta. Ratas con lesiones del hipocampo presentan déficits en el aprendizaje espacial en el laberinto radial (Olton et al., 1979; Jarrard 1983), el laberinto en T (Rawlins y Olton, 1982) y el laberinto acuático de Morris (Morris et al., 1982).

El cerebelo es la principal área cerebral involucrada en la regulación de determinados aspectos de la función y de la coordinación motoras (Snider et al., 1976; Schmahmann, 1991), en el aprendizaje motor (Vezina y Kim, 1999), en la memoria de trabajo (Desmond et al., 1997; Wiggs et al., 1999) y en ciertas funciones cognitivas no motoras (Arriada-Mendicoa et al., 1999). El cerebelo modula diversos procesos cognitivos, incluyendo atención visuo-espacial, navegación espacial, mecanismos de aprendizaje, planificación y adecuación temporal y modulación de la función verbal (Gordon, 2007; Oliveri et al., 2007). Algunos procesos de aprendizaje, como la respuesta de parpadeo condicionada, también se crean y almacenan en el cerebelo (Krupa et al., 1993; Krupa y Thompson, 1995). El cerebelo también colabora en el proceso cognitivo del aprendizaje espacial, sin limitarse a la componente motora (Martin et al., 2003).

En todos los procesos de aprendizaje espacial, memoria, actividad y coordinación motora, se produce una comunicación intercelular mediada por neurotransmisores y sus receptores y transportadores. Alteraciones en la neurotransmisión pueden llevar a disfunciones cognitivas y motoras. Se ha demostrado que el hipocampo modula el aprendizaje espacial y la memoria, principalmente a través de los receptores de glutamato NMDA (N-methyl-D-aspartate) y AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y la neurotransmisión glutamatérgica. Por otro lado, el cerebelo

modula la coordinación motora, principalmente a través del GABA (ácido γ -aminobutírico) extracelular y de la neurotransmisión GABAérgica (Cabrera-Pastor et al., 2018).

A continuación, se resumen los mecanismos por los que se altera la función cognitiva y motora en EH crónica. En el mecanismo que proponemos el fallo hepático conduce a hiperamonemia e inflamación periférica, induciendo neuroinflamación, que a su vez altera la neurotransmisión y la conectividad neuronal. Finalmente, la alteración de la neurotransmisión conduce al deterioro de la función cognitiva y motora.

4.2 Alteraciones de la neurotransmisión en EHM

4.2.1 Alteraciones de la neurotransmisión en cerebelo

El cerebelo es una de las primeras áreas que se altera en EHM, contribuyendo a las alteraciones cognitivas y motoras tempranas en EHM (Felipo et al., 2014; Butz et al., 2010).

La función de la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-GMPc en cerebelo modula algunos tipos de aprendizaje, entre estos la capacidad de aprendizaje de una tarea en el laberinto en Y (Yamada et al., 1996; Erceg et al., 2005b; Piedrafita et al., 2007; Llansola et al., 2009; Cabrera-Pastor et al., 2016b). La capacidad de aprendizaje de esta tarea está disminuida en ratas con EHM por hiperamonemia crónica y en ratas con anastomosis porta-cava (PCS), debido a que la función de la vía Glu-NO-GMPc está disminuida. A esta disminución contribuye el aumento del tono GABAérgico en cerebelo (Erceg et al., 2005b; Cabrera-Pastor et al., 2016b; Agusti et al., 2011; Dadsetan et al. 2016a).

La activación de receptores GABA_A en el cerebelo modula la coordinación motora (Cabrera-Pastor et al., 2018; Hancher et al., 2005). Ratas con hiperamonemia crónica o con EHM por PCS muestran un aumento del GABA extracelular y del tono GABAérgico en cerebelo (Cauli et al., 2009b; Gonzalez-Usano et al., 2014, Cabrera-Pastor et al., 2018; Agusti et al., 2011; Dadsetan et al. 2016a). Reduciendo la activación del receptor GABA_A, mediante el tratamiento con el antagonista bicuculina o con el modulador negativo del receptor GABA_A sulfato de pregnenolona, se recupera la coordinación motora y el aprendizaje en el laberinto en Y (Cauli et al., 2009b; Gonzalez-Usano et al., 2014). Por tanto, la alteración de la neurotransmisión GABAérgica induce incoordinación motora y también inhibe la vía Glu-NO-GMPc, reduciendo la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y en ratas con EHM.

4.2.2 Alteraciones de la neurotransmisión en hipocampo

El hipocampo modula el aprendizaje y la memoria espacial a través de los receptores de glutamato del tipo NMDA y AMPA (Llansola et al., 2007; Sanderson et al., 2008; Keifer et al., 2010; Wiltgen et al., 2010).

Las ratas PCS tienen alterado el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. Monfort et al. (2007) demostraron que estas ratas tienen alterada la potenciación a largo plazo y que esto se asocia a alteraciones en el contenido y expresión en membrana de subunidades de los receptores de glutamato AMPA y NMDA y a alteraciones en la vía GMPc-protein quinasa G.

Hernández-Rabaza et al. (2015) evaluaron los efectos del tratamiento crónico con sildenafil (inhibidor de la fosfodiesterasa 5 intracelular, que aumenta los niveles de GMPc intracelular) en ratas con EHM inducida por PCS en el aprendizaje espacial y la memoria evaluados en el laberinto de agua de Morris y el laberinto radial. Las ratas PCS presentan neuroinflamación en hipocampo, con activación de microglía y aumento de IL-1 β . Esto se asocia a alteraciones en la expresión en membrana de subunidades de los receptores AMPA, NMDA y GABA, y alteraciones de aprendizaje espacial y memoria en el laberinto de agua de Morris y en el laberinto radial. El tratamiento crónico con sildenafil reduce la activación microglial y los niveles de IL-1 β , normaliza la expresión en membrana de los receptores AMPA, NMDA y GABA y restaura la memoria espacial en ratas con EHM.

Cabrera-Pastor et al. (2016a) obtuvieron resultados similares tratando ratas hiperamonemicas con GMPc extracelular. Las ratas hiperamonemicas presentan neuroinflamación en hipocampo, con activación glial, niveles elevados de IL-1 β , TNF α e IL-4 y reducción de IL-10, alteración de la expresión en membrana en el hipocampo de subunidades de los receptores NMDA y AMPA, deterioro de la memoria de referencia espacial y de la memoria de trabajo. El aumento de GMPc extracelular, administrado por vía intracerebral mediante minibombas osmóticas revierte la activación de microglía y astrocitos y el aumento de TNF α e IL-4, pero no normaliza los niveles de IL-1 β e IL-10. Además, normaliza la expresión en membrana de las subunidades de los receptores AMPA pero no de los NMDA y restaura la memoria de referencia espacial pero no de la memoria de trabajo. Estos datos, juntos con el estudio de Hernández-Rabaza et al. (2015), sugieren que la neuroinflamación altera la neurotransmisión en hipocampo y el aprendizaje y la memoria espacial y que el GMPc

intra y extracelular modulan diferentes aspectos de la neuroinflamación, la neurotransmisión y el aprendizaje y memoria.

4.3 Papel de la neuroinflamación en EH

Como se ha comentado antes, la neuroinflamación juega un papel clave en las alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática a través de la alteración de la neurotransmisión.

La neuroinflamación se puede analizar *in vivo* mediante el análisis por tomografía de emisión de positrones (PET) de la unión de ligandos a la proteína translocadora (18 kDa) (TSPO). Cagnin et al. (2006) demostraron mediante PET que los pacientes cirróticos con EH presentaban un aumento de la unión de PK11195 a TSPO en el cerebro. Los pacientes con deterioro cognitivo más severo mostraron un mayor aumento en la unión de PK11195. Los autores hipotetizaron que una alteración de las células gliales podría correlacionar con la alteración de la función cerebral en EH. Estos datos sugieren la presencia de neuroinflamación en pacientes con EH, correlacionando con el grado de deterioro cognitivo.

Dennis y colaboradores (2014) llevaron a cabo un estudio por inmunohistoquímica de citocinas en tejido cerebral postmortem de alcohólicos crónicos con cirrosis y EH, alcohólicos sin EH y controles. Alrededor de la mitad de los pacientes con EH mostraron microglía activada con cuerpos celulares hipertrofiados y procesos cortos y espesos y niveles aumentados de IL-6. Los autores avanzaron la hipótesis que la proliferación microglial puede ser parte de una respuesta neuroprotectora temprana en EH que a lo largo del curso de la enfermedad falla a causa de factores etiológicos subyacentes, como los niveles elevados de amonio cerebral y la inflamación sistémica. Zemtsova et al., (2011) observaron un aumento de la expresión del marcador de activación microglial IBA-1 (del inglés “*ionized calcium binding adaptor molecule 1*”) en la corteza cerebral de pacientes con cirrosis con EH, pero no en pacientes fallecidos con cirrosis sin EH. También analizaron la expresión del mRNA y de las proteínas de iNOS y COX-2, y para citocinas proinflamatorias y CCL2 en corteza cerebral. No se encontraron diferencias entre pacientes con o sin EH y sujetos control. Este estudio señala un aumento de la activación de la microglía en pacientes con EH, pero no un aumento en los niveles de marcadores proinflamatorios.

Se ha encontrado también neuroinflamación en pacientes con hepatitis C (HC) que podría ser debida a la presencia del virus en el cerebro. Estudios postmortem muestran que la replicación viral puede tener lugar en el cerebro y la microglía puede actuar como locus para la infección y la posterior actividad neuroinflamatoria. (Vivithanaporn et al., 2010; Grover et al., 2012). Grover et al. (2012) evaluaron la presencia de neuroinflamación mediante dos técnicas de imagen in vivo independientes en pacientes con HC crónica leve y controles. Mediante espectroscopia de resonancia magnética, observaron que las ratios mio-inositol/creatina y colina/creatina en ganglios basales aparecían aumentados en pacientes con HC crónica comparados con los controles. Por PET con un ligando para la activación de microglía cerebral, PK11195, detectaron activación de la microglía, que se correlacionó positivamente con la viremia de HC y el metabolismo cerebral alterado. Estas evidencias indican que el virus de la hepatitis C induce neuroinflamación, lo que contribuye a las alteraciones cognitivas en los pacientes con HC. Aunque en pacientes con HC la neuroinflamación parece ser debida principalmente a la presencia del virus en el cerebro, (Vivithanaporn et al., 2010; Grover et al., 2012) los estudios de Cagnin (2006), Dennis (2014) y Zemtsova (2011) sugieren que la neuroinflamación también podría estar presente en pacientes con cirrosis hepática en ausencia de infección viral.

En 2018 Balzano et al. llevaron a cabo un estudio en cortes de cerebelo de pacientes fallecidos con distintos grados de enfermedad hepática. Los pacientes con esteatohepatitis de grado leve mostraron infiltración de linfocitos CD4 en las meninges, y en particular de los subtipos Th17 y Tfh, activación de microglía en la capa molecular y pérdida de neuronas tanto de Purkinje como de la capa granular. En este estadio la sustancia blanca no aparecía afectada. Con la progresión de la enfermedad hepática a etapas más avanzadas, la activación de las células gliales se extendía a la sustancia blanca, la glía de Bergman aparecía dañada en la capa molecular, y se producía una pérdida adicional de neuronas de Purkinje. Estos resultados demuestran que la neuroinflamación en cerebelo se produce en las primeras etapas de daño hepático, incluso antes de llegar a cirrosis. La neuroinflamación ocurre primero en capa molecular y afecta a la sustancia blanca en etapas más avanzadas, y se asocia a la infiltración de linfocitos periféricos Th17 y Tfh.

Modelos animales de hiperamonemia y EH presentan neuroinflamación, y esta contribuye al deterioro cognitivo. Cauli et al., (2007b) observaron que las ratas PCS,

uno de los modelos principales de EHM, presentan neuroinflamación, con un aumento en los niveles de marcadores inflamatorios como la IL-6 o actividad de COX en el cerebro. Las ratas PCS presentan una capacidad reducida para aprender una tarea en un laberinto en Y debido a la alteración de la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo (Erceg et al., 2005a). Cauli et al. (2007b) demostraron también que el tratamiento crónico con el antiinflamatorio ibuprofeno disminuía la neuroinflamación y restauraba la capacidad de aprender la tarea del laberinto en Y restableciendo la función de la vía del glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo. Estos resultados mostraron por primera vez que la neuroinflamación es un contribuyente esencial al deterioro cognitivo en EHM.

La neuroinflamación además participa en otros tipos de alteraciones cognitivas y motoras alterando otros mecanismos específicos que las modulan. Por ejemplo, la neuroinflamación también contribuye a la hipoquinesia en ratas con EHM y el tratamiento crónico con ibuprofeno recupera la función motora. Los mecanismos y las áreas cerebrales involucradas en la hipoquinesia inducida por neuroinflamación son diferentes de las involucradas en el aprendizaje en el laberinto Y. La hipoquinesia en las ratas PCS se debe al aumento de los niveles de glutamato extracelular en la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Una disminución de la cantidad de transportadores de glutamato contribuye a este aumento. El tratamiento crónico de ratas PCS con ibuprofeno normaliza la cantidad de transportadores de glutamato, reduce el glutamato extracelular en SNr y normaliza la actividad motora (Cauli et al., 2009c).

La presencia de neuroinflamación y su contribución a las alteraciones cognitivas y motoras también se han demostrado en otro modelo animal de EHM: ratas con ligadura del conducto biliar (BDL). Rodrigo et al. (2010) demostraron por inmunohistoquímica que las ratas BDL presentan activación de la microglía, principalmente en el cerebelo. Esto se asocia con aumento de los niveles de factores inflamatorios (óxido nítrico sintasa inducible, IL-1 β , PGE2) y con deterioro cognitivo e hipoquinesia. De forma similar a los estudios anteriores, el tratamiento crónico con ibuprofeno reducía la activación microglial y los marcadores inflamatorios y restauraba las funciones cognitivas y motoras en las ratas BDL.

Los estudios anteriores apoyan claramente la idea de que la EHM en condiciones de fallo hepático crónico se asocia con neuroinflamación que afecta a diferentes aspectos de la neurotransmisión que resultan en diferentes tipos de alteraciones cognitivas y

motoras. Esta neuroinflamación es consecuencia de la activación de dos tipos de células gliales, la microglía y los astrocitos.

Las ratas PCS presentan neuroinflamación con activación de microglía y aumento de TNF α . Agusti et al. (2017) evaluaron los efectos del aumento de GMPc mediante el tratamiento crónico con sildenafil (un inhibidor de la fosfodiesterasa 5, que degrada GMPc) en ratas PCS. Mostraron que las ratas PCS presentan neuroinflamación en cerebelo, con activación de microglía y astrocitos y aumento de IL-1 β y TNF α . Esta neuroinflamación se asocia con niveles aumentados de GABA extracelular, lo que induce incoordinación motora analizada en el *beam walking test*.

El aumento de los niveles extracelulares de GABA en cerebelo sería una consecuencia de la reversión de la función del transportador GAT3 en los astrocitos activados y de la reducción de la función y de la expresión en membrana del transportador GAT1 en las neuronas. Cabrera-Pastor et al. (2018) mostraron que las ratas con hiperamonemia crónica presentan neuroinflamación en cerebelo, con activación de microglía y astrocitos, aumento de los niveles de IL-1 β y TNF α y aumento de la expresión en membrana del receptor del TNF α TNFR1. Esto se asocia con una mayor expresión nuclear de NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), que activa la transcripción de glutaminasa, que a su vez aumenta los niveles de glutamato extracelular y conduce a un mayor transporte de glutamato y sodio por los astrocitos activados a través de los transportadores GLT1 y GLAST. El aumento del transporte de sodio y la activación de los astrocitos induce la reversión de la función del transportador de GABA GAT3, lo que lleva a la liberación de GABA y al aumento de GABA extracelular en cerebelo, causando una incoordinación. La administración intracerebral crónica de GMPc extracelular a ratas hiperamonémicas reduce la neuroinflamación y la expresión en membrana de TNFR1, normaliza NF-kB en el núcleo, la expresión de glutaminasa, el glutamato extracelular, GAT-3, el GABA extracelular en cerebelo y la coordinación motora (Cabrera-Pastor et al., 2018) (Figura 12).

Las ratas hiperamonémicas también presentan neuroinflamación en hipocampo, con activación de microglía y aumento de IL-1 β , principalmente en neuronas. Esto se asocia con una alteración de la expresión en membrana de los receptores de glutamato y GABA en el hipocampo, con un aumento de expresión en membrana de la subunidad alfa 1 de los receptores GABA $_A$, y de GluA2 de los receptores AMPA, y una disminución de la expresión en membrana de las subunidades NR1 y NR2A de los

receptores NMDA, y GluA1 de los receptores AMPA. Estas alteraciones se asocian con deficits de memoria espacial y aprendizaje en el laberinto acuático de Morris y en el laberinto radial. El tratamiento crónico con sildenafil, que aumenta los niveles de GMPc, reduce la activación de microglía y los niveles de IL-1 β , normaliza la expresión en membrana de los receptores AMPA, NMDA y GABA, y restaura la memoria espacial en ratas PCS. Estos datos apoyan la idea de la existencia de una interacción entre GMPc, neuroinflamación y neurotransmisión que juega un papel en deterioro cognitivo y puede ser una diana terapéutica para revertirlo.

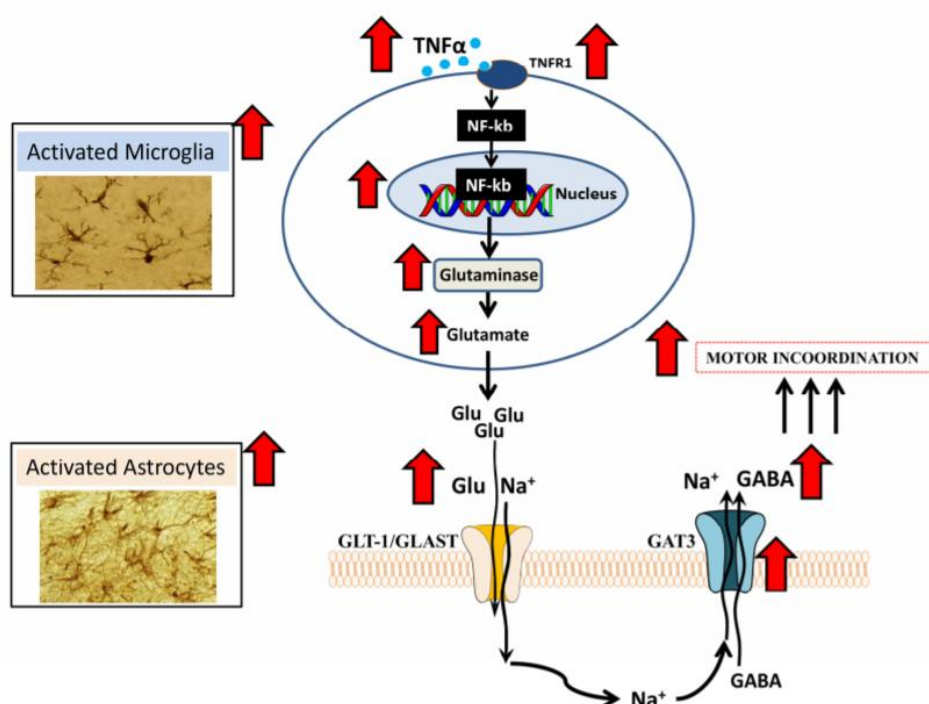


Figura12. La neuroinflamación en cerebelo de ratas hiperamonémicas altera los niveles de glutamato y GABA extracelular e induce incoordinación motora. Reversión por GMPc extracelular. (Cabrera-Pastor, 2018). Ver explicación en el texto.

Taoro-Gonzalez et al. (2019) han mostrado que el bloqueo del receptor de IL-1 revierte la activación de la microglía en el hipocampo, la corteza perirrinal y la corteza prefrontal y restaura la memoria en el *object recognition test* y la memoria de trabajo en el laberinto radial, pero no de las tareas que involucran un componente espacial (*object location test* y memoria de referencia en el laberinto radial). Estos datos sugieren que la neuroinflamación inducida por la IL-1 β estaría involucrada en el deterioro de la memoria no espacial, mientras que el deterioro de la memoria espacial sería independiente de IL-1 β y estaría mediado por otros factores proinflamatorios.

4.4 Papel de la inflamación periférica en EHM

La neuroinflamación en pacientes y modelos animales de EH parece ser inducida por la inflamación periférica.

Dadsetan et al. (2016a, 2016b) demostraron que el tratamiento periférico con infliximab, un anti-TNF α , en ratas con EHM previene la inducción de inflamación periférica y el aumento de IL-1 β y TNF α , así como la activación de microglía en hipocampo y cerebelo.

El tratamiento con infliximab normaliza la activación glial y los niveles de IL-1 β y TNF α , normaliza la función y la expresión en membrana de GAT3 y aumenta la expresión en membrana de GAT1 en ratas PCS. Estos cambios aumentan el transporte de GABA en los astrocitos y las neuronas y reducen los niveles extracelulares de GABA en cerebelo a niveles normales. Esto se asocia con una restauración de la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y y de la coordinación motora en las ratas PCS. Esto indica que la reducción de la inflamación periférica mejora la función cognitiva y motora en EH.

Como se ha comentado en el apartado 3.4, la aparición de EHM en los pacientes cirróticos se asocia a un cambio en la inflamación periférica hacia un tipo similar al de enfermedades autoinmunes que podría promover la infiltración de células del sistema inmune en cerebro conduciendo a neuroinflamación que altera la neurotransmisión conduciendo al deterioro cognitivo y motor.

5. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la encefalopatía hepática

Los tratamientos tradicionales para la EH tienen como objetivo reducir los niveles de amonio y consisten en reducir la ingesta de proteínas en la dieta, o en tratar de reducir la producción de amonio por la flora intestinal o su transporte a la sangre mediante el uso de disacáridos no absorbibles como lactulosa y lactilol, probióticos o antibióticos no absorbibles como rifaximina (Felipo, 2013; Suraweera et al., 2016).

Históricamente, se solía recomendar la restricción de proteínas en la dieta para reducir la producción de amonio (Swaminathan et al., 2018), pero esto puede conducir al desarrollo de sarcopenia y a empeorar la EH, por lo que actualmente no se recomienda (Cross et al., 2017).

Se está ensayando el uso de captadores de amonio para aumentar su eliminación y reducir su concentración sistémica. El glicerol-fenilbutirato (GPB) proporciona una vía alternativa para la eliminación renal de amonio a través de fenilacetil-glutamina (Figura 13). Un reciente ensayo clínico de fase II ha demostrado que el GPB reduce los episodios de EH clínica, se asocia con una disminución de las hospitalizaciones, y disminuye el amonio en plasma (Rockey et al., 2014).

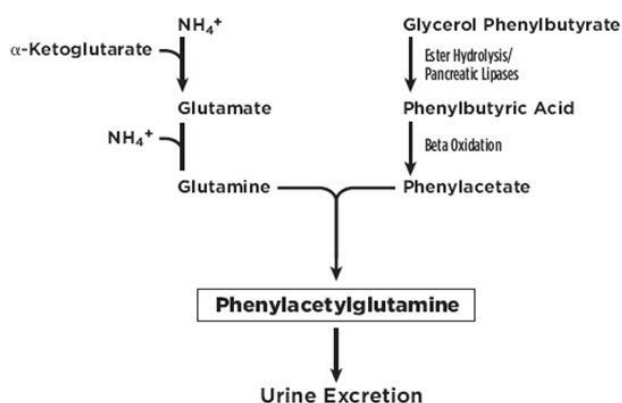


Figura 13. Mecanismo por el que el fenilbutirato de glicerol (RAVICTI®) puede aumentar la eliminación de amonio.

La l-ornitina-l-aspartato (LOLA) estimula la actividad enzimática de la carbamilsfotato sintetasa en los hepatocitos periportales y de la glutamina sintetasa en los hepatocitos pericentrales, aumentando la excreción de urea (Jover-Cobos et al., 2014). El uso de LOLA mejora la HE (Bai et al., 2013), aunque no induce un beneficio significativo para pacientes con MHE (Jiang et al., 2009). A pesar de reducir en un primer momento los niveles de amonio en sangre, sus efectos parecen ser temporales, ya que se observa un efecto rebote al dejar el medicamento. No obstante, la LOLA es bien tolerada y ha demostrado tener un efecto superior al del placebo (Hadjihambi y Jalan, 2005).

Además, se han descrito nuevos enfoques terapéuticos que actúan sobre dianas específicas en cerebro, y hay grandes expectativas de que mejoren la función cognitiva y motora en pacientes con EHM (Felipo, 2013). Se ha demostrado que el aumento de los niveles de GMPc en cerebelo mediante el uso de inhibidores de la fosfodiesterasa 5 restaura la función cognitiva en ratas con EHM (Erceg et al., 2005a y 2005b). Estos inhibidores se están utilizando en el tratamiento de la disfunción eréctil en muchos pacientes cirróticos y no han mostrado efectos adversos (Felipo, 2013). Aunque pueden exacerbar la hipertensión portal y la circulación hiperdinámica en pacientes con cirrosis avanzada e hipertensión portopulmonar (Wang Y. et al., 2006), parecen ser

prometedores para la mejora del deterioro cognitivo en pacientes con EHM (Felipo, 2013).

También se ha demostrado que la reducción de la activación de los receptores GABA_A (v.g. con bicuculina) restaura la capacidad de aprendizaje en ratas con EHM (Cauli et al., 2009b). El tono GABAérgico puede ser modulado por neuroesteroides y benzodiacepinas que actúan sobre diferentes subtipos de receptores. Hay esteroides GAMSAs (antagonistas esteroides moduladores del receptor GABA_A) que reducen la activación del receptor GABA_A, disminuyendo su potenciación por neuroesteroides (Ahboucha et al., 2006). Los GAMSAs tienen efectos positivos sobre el deterioro del aprendizaje en ratas con EH (Turkmen et al., 2004) y restauran la coordinación motora, el aprendizaje espacial y la memoria en las ratas con hiperamonemia o EHM (Johansson et al., 2015). El compuesto GR3027 ha superado con éxito los ensayos de seguridad humana y ahora se está evaluando su utilidad terapéutica en pacientes cirróticos con HE (Johansson et al., 2016).

Reducir la neuroinflamación también puede ser una estrategia útil para tratar la EHM (Felipo, 2013). El ibuprofeno reduce la neuroinflamación y restaura la capacidad de aprendizaje y la hipoquinesia en ratas con EHM (Cauli et al., 2009c; Cauli et al., 2007b; Rodrigo et al., 2010). Sin embargo, en pacientes cirróticos no se recomienda el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos ya que pueden inducir efectos secundarios en los riñones. Otros tipos de medicamentos antiinflamatorios, como los inhibidores de p38, pueden resultar beneficiosos (Agusti et al., 2011). Prevenir la activación de la microglía puede reducir la neuroinflamación sin afectar a los riñones. Los inhibidores de p38 reducen la activación de la microglía y la neuroinflamación y restauran la función cognitiva y motora en ratas con MHE (Agusti et al., 2011). Actualmente se están desarrollando inhibidores de p38 para su uso en diversas enfermedades inflamatorias.

La microbiota intestinal y la translocación bacteriana juegan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades hepáticas crónicas (Arab et al., 2018), lo que puede contribuir a la aparición de encefalopatía hepática, por lo tanto intervenciones dirigidas a modificar la microbiota, como los antibióticos, los probióticos y el trasplante de microbiota fecal (FMT), pueden mejorar la salud de los pacientes (Sun y Shen, 2018).

5.1 Microbiota

El término microbioma se refiere a los genomas colectivos de los microorganismos en un entorno particular, y la microbiota es la comunidad de los microorganismos mismos. Aproximadamente 100 billones de microorganismos (la mayoría de ellos bacterias, pero también virus, hongos y protozoos) residen en el tracto gastrointestinal humano (Bull y Plummer, 2014, Rath y Dorrestein, 2012). El genoma humano consta de unos 23000 genes, mientras que el microbioma codifica más de tres millones de genes que producen miles de metabolitos, lo que influye en la salud del sujeto (Bull y Plummer, 2014, Vyas y Ranganathan, 2012, Valdes et al., 2018). La circulación enterohepática entre el tracto gastrointestinal y el hígado proporciona acceso directo de los metabolitos del huésped a la microbiota y viceversa. Los productos microbianos secretados, incluidos neurotransmisores e inmunomoduladores, pueden entrar en la circulación y actuar sobre órganos distantes (Collins et al., 2012).

Estudios en animales (De Palma et al., 2017, Wiley et al., 2017) y en humanos (Goodrich et al., 2014, Sonnenburg y Sonnenburg, 2014, Beaumont et al., 2016) han demostrado que la microbiota intestinal es clave para muchos aspectos de la salud humana, incluyendo aspectos inmunes (Zhang et al., 2015a), metabólicos (Rothschild et al., 2018) y neuroconductuales (Hakansson y Molin, 2011, Levy et al., 2017).

La microbiota en un adulto sano es relativamente estable y específica del individuo, y los factores ambientales relacionados con la dieta y las drogas son los determinantes más importantes de la composición de la microbiota (Goodrich et al., 2014, Valdes et al., 2018). Pueden manifestarse cambios drásticos en la microbiota como consecuencia de perturbaciones como antibióticos, infección o colonización por microbios comensales ajenos, grandes cambios en la dieta o enfermedades no infecciosas que alteran la función gastrointestinal (Costello et al., 2012; Cox y Weiner, 2018). Dependiendo de la magnitud y duración de la interrupción, la microbiota es capaz de recuperarse y volver a su composición original. Sin embargo, perturbaciones repetidas pueden afectar la recuperación y por lo tanto tener un efecto sobre la fisiología del huésped (Figura 14).

Actualmente, gracias a la tecnología de secuenciación de genes de alto rendimiento, el estudio de la microbiota intestinal consta de dos etapas principales: (1) secuenciación de genes bacterianos basada en el 16S ácido ribonucleico ribosómico (rARN); y (2) análisis bioinformático (Jandhyala et al., 2015).

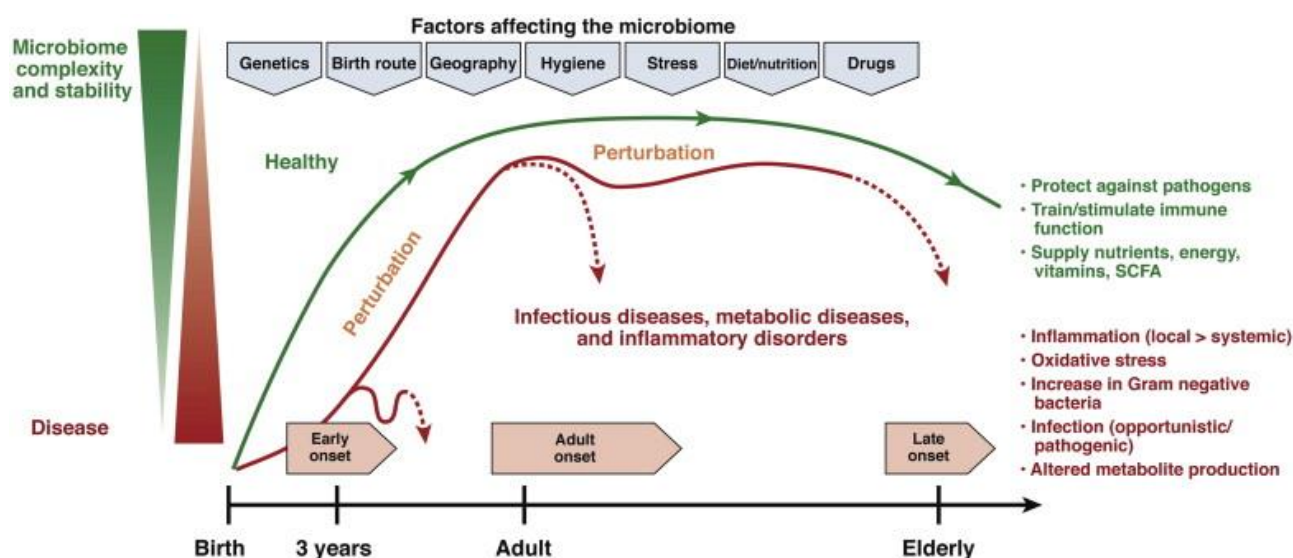


Figura 14. Factores que afectan la estabilidad y la complejidad del microbioma intestinal en salud y enfermedad. Muchos factores afectan el desarrollo del microbioma, incluyendo, entre otros, la genética, la dieta y los medicamentos. Algunos de estos factores pueden introducir perturbaciones que afectan la complejidad y la estabilidad del microbioma, pudiendo inducir disbiosis microbiana. Las características de un microbioma desequilibrado incluyen, por ejemplo, un aumento de bacterias Gram negativas vinculadas a un entorno de estrés oxidativo e inflamación, y la producción de determinados metabolitos (Kostic et al., 2014).

La microbiota intestinal juega un papel muy importante en el metabolismo de los nutrientes. La fermentación de los carbohidratos que escapan a la digestión proximal y de los oligosacáridos no digeribles por organismos colónicos como *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* y *Enterobacteria*, resultan en la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como el butirato, el propionato y el acetato, que son fuentes ricas de energía para el huésped (Macfarlane y Macfarlane, 2003; Sartor, 2008; Jandhyala et al, 2015). Los SCFA, particularmente el butirato, son una fuente importante de energía para los enterocitos intestinales e influyen en la función de la barrera gastrointestinal a través de la estimulación de las *tight junction* y la producción de moco (Brahe et al., 2013; Willemsen et al., 2003).

5.1.1 Microbiota en inmunidad e inflamación

El desarrollo de algunas características del sistema inmune, y en particular las asociadas con la inmunidad adaptativa, ha coincidido con la adquisición de una microbiota compleja, sugiriendo que una gran parte de esta maquinaria ha evolucionado como medio para mantener una relación simbiótica con diversas comunidades microbianas. A su vez, la microbiota promueve y modula múltiples aspectos del sistema inmune. Patologías como las alergias o trastornos autoinmunes e inflamatorios, se deben a

respuestas inmunitarias mal dirigidas contra antígenos propios, derivados de la microbiota o ambientales (Belkaid y Hand, 2014).

El mayor número de células inmunes en el cuerpo reside en sitios colonizados por comensales, como la piel o el tracto gastrointestinal. En cambio, el principal objetivo de la microbiota sobre el sistema inmune es el de reforzar la barrera de inmunidad y, por lo tanto, su propia contención. Una estrategia central utilizada por el huésped para mantener su relación homeostática con la microbiota es minimizar el contacto entre los microorganismos y la superficie de las células epiteliales, limitando de esa forma la inflamación del tejido y la translocación microbiana. En el tracto gastrointestinal esta contención se logra mediante la acción combinada de células epiteliales, moco, IgA, péptidos antimicrobianos y células inmunes (Macpherson et al., 2009).

En condiciones normales, la mayoría de las células Th17 y Th1 se encuentran en el tracto gastrointestinal, y se diferencian a partir de señales derivadas de la microbiota (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2008; Macpherson y Harris, 2004).

Mientras en condiciones normales se considera que la detección de comensales constitutivos juega un papel en el control de la homeostasis, en situaciones patológicas se producen respuestas activas contra la flora (Belkaid y Hand, 2014).

La constante exposición del intestino a la microbiota, a los antígenos, a los metabolitos y a los patógenos derivados de los alimentos requiere una red altamente compleja de vías reguladoras de la inmunidad (Figura 15). La falta de regulación puede conducir a estados patológicos como enfermedades inflamatorias del intestino, alergias o síndromes metabólicos (Belkaid y Hand, 2014). El establecimiento de tolerancia a las bacterias comensales no podría inducirse en ausencia de señales derivadas de las mismas (Kiyono et al., 1982; Sudo et al., 1997; Wannemuehler et al., 1982; Weiner et al., 2011). Las células T reguladoras Foxp3 (Tregs) cumplen un papel central en este proceso. Estas células mantienen la homeostasis tanto a nivel periférico como de mucosa y la interrupción de su homeostasis resulta en la pérdida de tolerancia y el desarrollo de respuestas efectoras aberrantes en el intestino (Josefowicz et al., 2012; Mucida et al., 2005; Worbs et al., 2006). El intestino tiene poblaciones de células presentadoras de antígenos (por ejemplo células dendríticas), que producen factores que inducen Tregs, como TGF β y ácido retinoico (Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2007; Sun et al., 2007). Los comensales pueden controlar la presentación de antígenos por las células dendríticas de la mucosa, y promover la inducción de macrófagos

residentes de lámina propia asociados con la expansión local de las células Treg (Chieppa et al., 2006; Niess y Adler, 2010).

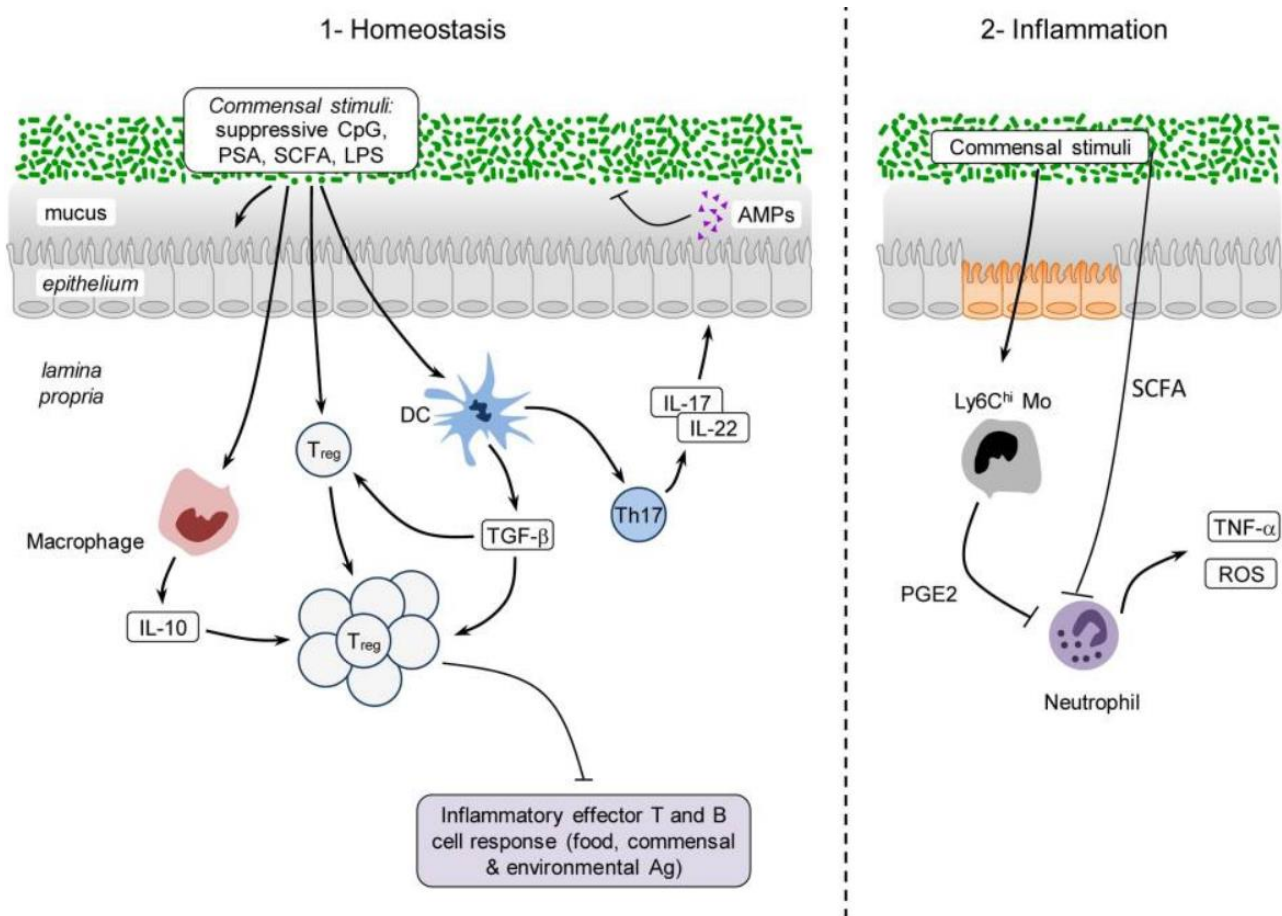


Figura 15. Modulación del sistema inmune por la microbiota durante el estado estacionario y la inflamación. 1) Los comensales promueven la inducción de células T reguladoras a través de la detección por las células T o las células dendríticas de productos microbianos o metabolitos. Otros comensales promueven la inducción de células Th17 que pueden regular la función y la homeostasis de las células epiteliales. Un componente importante de la inmunidad innata de los mamíferos es la producción de pequeños péptidos catiónicos antimicrobianos (AMPs). En el contexto de la inflamación el papel regulador de la microbiota puede ser explicado por mecanismos similares. 2) Los metabolitos derivados de los comensales pueden tener un efecto sistémico sobre las células inflamatorias. Por ejemplo, los SCFAs pueden inhibir la activación de neutrófilos. Los monocitos inflamatorios también pueden responder a ligandos derivados de microbios produciendo mediadores como PGE2 que limitan la activación de neutrófilos y el daño tisular (Belkaid y Hand, 2014).

La microbiota puede influir en el equilibrio entre Th17 y Treg. Este equilibrio se altera en ratones “germ free” o tratados con antibióticos (Atarashi et al., 2008 y 2011; Hall et al., 2008; Ivanov et al., 2008). Los metabolitos producidos por microbios comensales, y en particular los SCFAs, también juegan un papel crítico en la mediación del efecto de la microbiota intestinal en la inducción de Treg tanto en el intestino como en el colon (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013; Smith et al., 2013). Los niveles de SCFAs se han correlacionado con el número de Tregs en colon, y el butirato en particular puede

favorecer la diferenciación a Treg tanto *in vitro* como *in vivo* (Furusawa et al., 2013). Tales efectos no se limitan al tracto gastrointestinal, ya que tanto el butirato como el propionato influyen en el desarrollo de Treg a nivel periférico (Arpaia et al., 2013).

5.1.2 Eje microbiota-intestino-cerebro

La microbiota intestinal controla el desarrollo y la función del sistema nervioso entérico (SNE) y del sistema nervioso central (SNC) (Hyland y Cryan, 2016; Sharon et al., 2016). Estudios en animales “germ free” muestran que la ausencia de la microbiota residente del huésped en estos animales, compromete notablemente la forma y la maduración de la microglía (Sun y Shen, 2018). La recolonización de animales *germ free* con una microbiota compleja puede restaurar parcialmente las características de la microglía (Erny et al., 2015). Estas observaciones sugieren que la microbiota intestinal y los metabolitos microbianos, como SCFAs, vitamina K, o ácido linoleico conjugado, son fundamentales para la maduración y la función de la microglía (Erny et al., 2015). En ausencia de microbiota intestinal, la barrera hematoencefálica se hace más permeable a las macromoléculas, debido a la disminución de la expresión de proteínas clave en las *tight junctions* del endotelio cerebral. Esta permeabilidad disminuye tras la reintroducción de la microbiota intestinal o con la administración de butirato (Braniste et al., 2014).

La alteración de la microbiota intestinal aumenta la neuroinflamación (Sampson y Mazmanian, 2015). Los cambios en la composición de la microbiota y en la permeabilidad intestinal podrían conducir a la activación de los TLRs expresados en microglía (Olson y Miller, 2004) y astrocitos (Bowman et al., 2003) y a la liberación de citocinas proinflamatorias (Lucas y Maes, 2013). En particular el LPS, que se encuentra en la pared de las bacterias Gram-negativas, puede activar varios tipos de células inmunes, incluidos macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Una vez activadas, estas células producen citocinas proinflamatorias, como IL2, IL-1 β , IL-6 y TNF α , que afectan a la función cerebral (Banks y Robinson, 2010). Estas citocinas proinflamatorias actúan sobre los receptores expresados por las neuronas y las células gliales lo que conduce a neuroinflamación y puede inducir la muerte neuronal (Dantzer et al., 2000) (Figura 16).

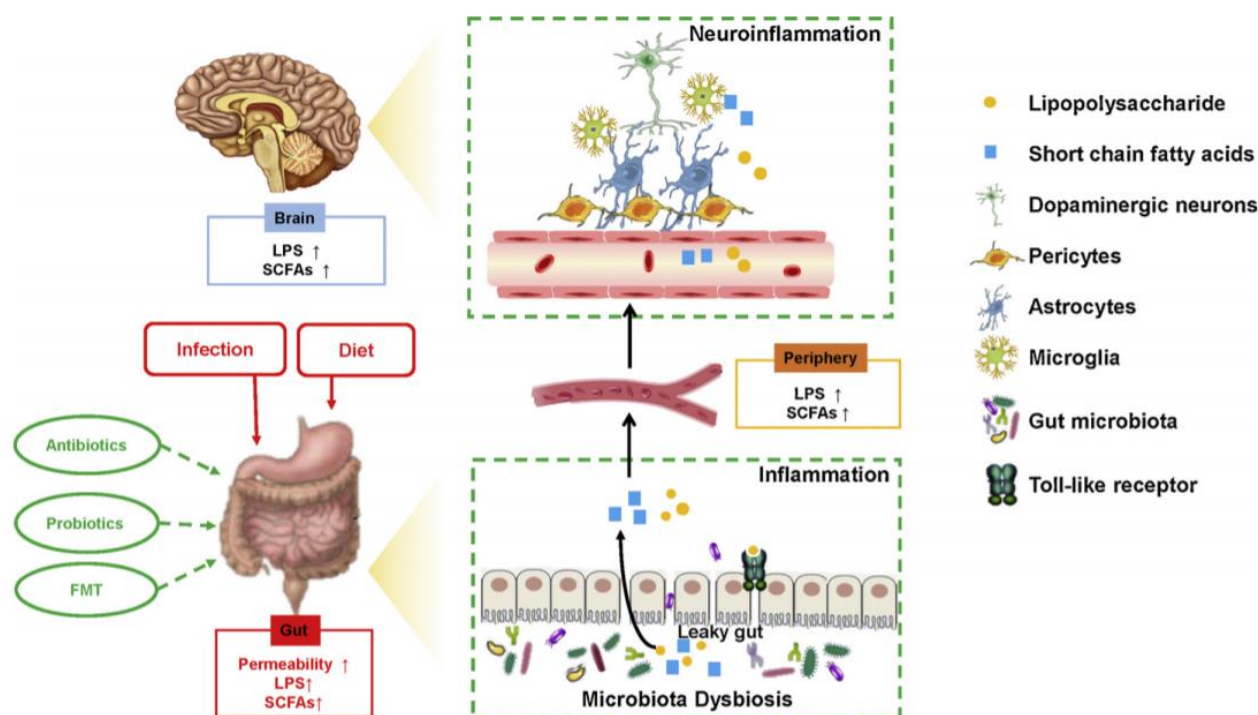


Figura 16. Eje microbiota-intestino-cerebro. Múltiples factores, como la dieta y las infecciones, afectan la composición de la microbiota intestinal del huésped, y alteran los metabolitos microbianos, como SCFAs, lo que puede inducir inflamación y pérdida de la función de barrera (intestino permeable). El intestino permeable promueve una mayor translocación de componentes bacterianos patógenos (por ejemplo LPS) y SCFAs desde la mucosa intestinal a la circulación sistémica, donde activan células de la inmunidad innata induciendo la producción de citocinas proinflamatorias, lo que resulta en inflamación sistémica y función intestinal anormal. Las citocinas proinflamatorias sistémicas pueden transmitir las alteraciones periféricas al cerebro, activando la microglía o los astrocitos, lo que resulta en neuroinflamación. Estos mecanismos pueden conducir a deterioro de la función del SNC y a alteraciones cognitivas o motoras o a depresión. Por tanto, terapias basadas en microbiota, como antibióticos, probióticos y el trasplante de la microbiota fecal, podrían revertir estas alteraciones (Sun y Shen, 2018).

La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la interconexión entre intestino y cerebro, y se ha denominado este sistema “eje microbiota-intestino-cerebro” (Bercik, 2011). En diversas enfermedades del SNC existe una disbiosis de la microbiota intestinal (Sun y Shen, 2018). Por ejemplo, en pacientes con esclerosis múltiple se observa un aumento de *Methanobrevibacter* y *Akkermansia* y una disminución de *Butyricimonas* (Jangi et al., 2016). En la microbiota de pacientes con enfermedad de Alzheimer se observa una disminución de *Firmicutes* y de *Bifidobacterium*, y un aumento de *Bacteroidetes* (Vogt et al., 2017b). Pacientes con enfermedad de Parkinson sufren una alta prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* (Charlett et al., 1999). En estos sujetos también disminuyen las especies con propiedades antiinflamatorias, como *Blautia*, *Coprococcus*, y *Roseburia* y aumenta *Lactobacillus*. Además, se ha encontrado una correlación entre el número de *Enterobacteriaceae* y la severidad de inestabilidad postural y dificultad para caminar (Sun y Shen, 2018).

Los mecanismos a través de los cuales la microbiota regula la función cerebral aún no se conocen bien (Sun y Shen, 2018). El SNE y el SNC comunican a través de múltiples vías, incluyendo el nervio vago (Wang et al., 2002), los neurotransmisores serotoninérgicos (Browne et al., 2012), el sistema inmunitario (Diamond et al., 2011) y los metabolitos bacterianos como SCFAs (Erny et al., 2015). Estando compuesto principalmente por fibras sensoriales, el nervio vago actúa como la vía aferente primaria para transferir información microbiana e inmune desde el intestino al SNC (Browning and Mendelowitz, 2003; Maier et al., 1998; Pavlov and Tracey, 2015). Estudios en animales han demostrado que la microbiota intestinal puede activar el nervio vago, y modular la función del cerebro y el estado de ánimo (Tanida et al., 2005). El nervio vago puede diferenciar entre bacterias no patógenas y patógenas, e inducir efectos ansiogénicos o ansiolíticos, dependiendo de la naturaleza del estímulo. El intestino puede instigar un reflejo antiinflamatorio mediante señales vágales aferentes al cerebro que activan una respuesta eferente, liberando mediadores como acetilcolina que, a través de una interacción con las células inmunes, atenúa la inflamación.

5.1.3 Papel de la microbiota intestinal en la patogénesis y prevención de la enfermedad hepática

En la enfermedad hepática crónica, un aumento de la permeabilidad intestinal debida a disbiosis resulta en la translocación de bacterias y endotoxinas, lo que puede contribuir a la aparición de encefalopatía hepática (Bashiardes et al., 2016). Diferentes moléculas derivadas de las bacterias pueden penetrar desde el intestino hasta el hígado, como por ejemplo la metilamina, compuestos orgánicos volátiles, como SCFAs, y moléculas de patrón molecular asociadas a patógenos (PAMPs). Estos últimos incluyen LPS, ácido lipoteicoico, peptidoglicano, flagellina y secuencias de ADN CpG no metiladas. Algunas de estas moléculas se unen a TLRs ubicados en la membrana de las células hepáticas, como células estrelladas hepáticas, células de Kupffer y hepatocitos, y activan vías de señalización clave dirigidas a la respuesta inflamatoria (Paolella et al., 2014), o promueven la producción de acetato, que induce especies reactivas del oxígeno (Sarkola y Eriksson, 2001; Hartmann et al., 2012; Ilan, 2012).

NASH y NAFLD se asocian a cambios en la composición de la microbiota intestinal. Algunos estudios muestran que ratones obesos modificados genéticamente tienen una carga de *Bacteroidetes* significativamente disminuida, en comparación con los ratones control (Ley et al., 2005). De hecho, los pacientes con NASH tienen un recuento más

bajo de *Bacteroidetes* en comparación con las personas obesas sin NASH (Mehal, 2013). En pacientes con NAFLD, se observa una mayor abundancia de *Escherichia*, *Anaerobacter* y *Streptococcus*, mientras que *Ruminococcaceae*, *Alistipes* y *Prevotella* están disminuidos en estos pacientes (Power et al., 2014; Jiang et al., 2015).

La cirrosis hepática humana induce alteraciones en las *tight junctions* de los enterocitos, causando una reducción significativa en la expresión de ocludina y claudina-1 (Altamirano-Barrera et al., 2018), con consecuente aumento de la permeabilidad intestinal. Este aumento de permeabilidad se asocia a un aumento del estrés oxidativo inducido por el óxido nítrico y por una regulación positiva en la mucosa de mediadores inflamatorios como el TNF α (Qamar, 2015; Bellot et al., 2013). Consecuentemente los pacientes cirróticos presentan un excesivo crecimiento bacteriano en el intestino delgado (Casafont et al., 1996), lo que lleva a una mayor exposición hepática al etanol y al LPS (Qamar, 2015) dando lugar a un mayor grado de disfunción hepática. Estos pacientes muestran una mayor abundancia en la microbiota salival de *Fusobacteriaceae*, *Prevotellaceae* y *Enterococcaceae*, en comparación con los controles, lo que se asocia con cambios en las defensas bacterianas, inflamación y aumento del riesgo de hospitalización debido a insuficiencia hepática. A nivel del duodeno la microbiota de pacientes cirróticos se enriquece en *Firmicutes*, mientras que las bacterias más abundantes en controles son *Proteobacterias* (Bajaj et al., 2015a). Además, los pacientes cirróticos con EH previa, muestran una disminución de la abundancia relativa de taxa nativas (*Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*), que se asocia con una inflamación significativa debida a la activación de Th1 y Th17 a nivel de la circulación sistémica.

5.2 Laxantes simples y trasplante de microbiota fecal

Antes de la adopción generalizada de disacáridos no absorbibles, el tratamiento más utilizado para la EH eran los laxantes simples. Tras su uso se observan efectos beneficiosos, y eso sugiere que la evacuación intestinal sola puede mejorar esta patología (Manning y Delp, 1958). El polietilenglicol es un laxante de uso común, seguro y altamente efectivo que recientemente se ha propuesto como un posible agente terapéutico para el tratamiento de EH clínica (Rahimi et al., 2014).

Otra opción terapéutica puede ser el trasplante de microbiota fecal (FMT) de un donante compatible con la disbiosis encontrada en EH. Bajaj et al. (2017) proponen que esta

técnica es segura y reduce el número de hospitalizaciones relacionadas con el daño hepático, además de mejorar la función cognitiva. A pesar de ello en 2019 la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) informó sobre la muerte de dos pacientes después de un trasplante de heces, debido a que la microbiota fecal de un donante estaba contaminada con *E. coli* resistente a una variedad de preparaciones antimicrobianas (<https://www.fda.gov/safety/medical-product-safety-information/fecal-microbiota-transplantation-safety-alert-risk-serious-adverse-events-likely-due-transmission>).

5.3 Prebióticos

Los prebióticos son oligosacáridos no digeribles presentes en leche, verduras, cereales y frutas. Actúan como fuente de alimentos para la microbiota del huésped (Sanders et al., 2016), estimulando selectivamente la actividad o el crecimiento de especies bacterianas beneficiosas, como *Bifidobacterias* (Altamirano-Barrera et al., 2018; Schrezenmeir y Vrese, 2001; Patel y Denning, 2013). Entre los prebióticos la lactulosa y el lactitol son disacáridos no absorbibles comúnmente utilizados en el tratamiento de la EH (Patidar y Bajaj, 2015). Una vez administrados, son degradados a ácidos orgánicos de cadena corta en el colon por acción de la microbiota, creando un ambiente ácido y un gradiente osmótico en la luz intestinal (Gerber y Schomerus, 2000). Este ambiente ácido desplaza el equilibrio $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ hacia la forma protonada del amonio (NH_4^+) que, al contrario que el NH_3 , no atraviesa las membranas celulares, por lo que se reduce el transporte de amonio del intestino al torrente sanguíneo. También se hipotetiza que el ambiente ácido reduce las bacterias amoniagénicas. Además, el aumento de la osmolaridad produce un efecto laxante que provoca la eliminación del exceso de amonio fecal (Gerber y Schomerus, 2000). La lactulosa es el disacárido más utilizado para el tratamiento de la EH (Patidar y Bajaj, 2015). Los efectos secundarios comunes de la lactulosa incluyen flatulencia, molestias abdominales y diarrea (Gerber y Schomerus, 2000; Patidar y Bajaj, 2015). Tiene efectos beneficiosos tanto en EH clínica como en EHM (Kornerup et al., 2018). Además, previene episodios recurrentes de EH, limita el riesgo de eventos adversos graves como hemorragia por varices, peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatorenal y reduce la mortalidad (Gluud et al., 2016). La lactulosa se encuentra disponible en todos los lugares y es muy barata. Por lo tanto, en la actualidad se considera el pilar de la prevención y el tratamiento de todas las

manifestaciones de la EH (Kornerup et al., 2018; Gluud 2016). El lactitol (que no está disponible en los EE. UU.) generalmente tiene mejor tolerancia y es tan eficaz como la lactulosa (Gerber y Schomerus, 2000).

5.4 Probióticos

Los probióticos son productos que contienen microorganismos vivos que, si se administran en cantidades adecuadas, confieren efectos beneficiosos al huésped mediante la modificación de la microbiota intestinal (Altamirano-Barrera et al., 2018; Schrezenmeir y Vrese, 2001; Patel y Denning, 2013). Esto resulta en una reducción de la inflamación sistémica, que no necesariamente se acompaña a una reducción de los niveles de amonio (Acharya y Bajaj, 2018; Lunia et al., 2014; Agrawal et al., 2012; Bajaj et al., 2014). *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los probióticos más utilizados en el tratamiento de diferentes enfermedades hepáticas (Altamirano-Barrera et al., 2018). Algunos de los beneficios relacionados con el uso de probióticos incluyen: 1) disminución de la población de bacterias patógenas por inducción de péptidos antimicrobianos, lo que reduce la inflamación y activa el sistema inmunitario del huésped; 2) recuperación del equilibrio entre bacterias comensales y patógenas mediante selección competitiva; 3) inhibición de la translocación bacteriana al mantener la integridad de la barrera intestinal; 4) reducción de productos tóxicos que provienen de los alimentos o de la propia microbiota, como LPS (Nakamura et al., 2010); 5) mejora del estado circulatorio hiperdinámico en la función hepática (Altamirano-Barrera et al., 2018; He et al., 2016). Tanto *Bifidobacterium* como *Lactobacillus* inducen una mejora en las pruebas de función hepática, como la reducción de alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, y gammaglutamiltransferasa en suero. Además, se ha observado que disminuyen los niveles de lipoproteína de baja densidad y de la endotoxemia causada por la translocación del LPS intestinal. También modulan la respuesta inflamatoria aumentando IL-10 y reduciendo citocinas proinflamatorias como TNF α (Altamirano-Barrera et al., 2018; Abdou et al., 2016). En el tratamiento de EH se utilizan probióticos que reducen los niveles de amonio mediante varios mecanismos: disminuyendo la actividad de la ureasa bacteriana, acidificando el pH y mejorado el estado nutricional del epitelio intestinal (Pho y Chang, 2012). El probiótico actualmente más utilizado es el VSL#3 (Swaminathan et al., 2018). Los probióticos no reducen la mortalidad, pero pueden reducir las concentraciones plasmáticas de amonio, los

episodios de EH clínica y mejorar la calidad de vida y presentan efectos adversos mínimos (Swaminathan et al., 2018; Dalal et al., 2017). Aún no se han determinado la dosis óptima y las especies de probióticos más efectivas para el tratamiento de la EH (Swaminathan et al., 2018; Viramontes Hörner et al., 2017).

Los simbióticos son una combinación de prebióticos y probióticos (Swaminathan et al., 2018). Su utilidad terapéutica en la EH sigue siendo incierta, aunque varios ensayos demuestran posibles efectos beneficiosos (Swaminathan et al., 2018; Liu et al., 2004; Pratap Mouli et al., 2015).

5.5 Antibióticos

En las últimas décadas se ha investigado el uso de antibióticos orales para la modulación de la flora intestinal y la reducción de la producción de amonio en el tratamiento de la EH (Swaminathan et al., 2018). La neomicina, un antibiótico aminoglucósido poco absorbible que alcanza altas concentraciones en el intestino, actúa además como un inhibidor de la glutaminasa, reduciendo así los niveles de amonio (Hawkins et al., 1994). Fue el primer agente antibiótico ampliamente utilizado en el tratamiento de la EH. Sin embargo, los efectos adversos como ototoxicidad y nefrotoxicidad, y el desarrollo de nuevos agentes ha hecho que deje de usarse en la práctica clínica (Swaminathan et al., 2018). El uso de metronidazol a largo plazo puede provocar nefrotoxicidad y neurotoxicidad (Morgan et al., 1982). De la misma forma la vancomicina es nefrotóxica y su uso prolongado aumenta el riesgo de lesión renal y el desarrollo de resistencia bacteriana al antibiótico (Leise et al., 2014). La rifaximina se ha convertido en el antibiótico de elección en el tratamiento de la EH debido a su seguridad, eficacia y tolerabilidad (Suraweera et al., 2016). En comparación con la neomicina, la rifaximina es igual de efectiva en reducir los niveles de amonio en sangre e induce menos efectos adversos (Pedretti et al., 1991). En comparación con la lactulosa, la rifaximina presenta una eficacia similar (Jiang et al., 2008).

5.5.1 Rifaximina

La rifaximina es un análogo estructural de la rifampicina que ejerce sus efectos antibióticos a través de la inhibición de la síntesis del ARN bacteriano al unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana dependiente de ADN (DuPont, 2016). La actividad de la rifaximina se limita al tracto gastrointestinal; debido a su no absorción

sistémica, los niveles en sangre son insignificantes tras la administración oral tanto en individuos sanos como en pacientes con infección intestinal (Descombe et al., 1994; Taylor et al., 2008). Sin embargo, las concentraciones fecales son altas (Jiang et al., 2000). Se cree que la actividad de la rifaximina contra los enteropatógenos se debe, al menos en parte, a su mayor solubilidad en presencia de ácidos biliares en comparación con el agua (Darkoh et al., 2010). La rifaximina es un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas tanto aerobias como anaerobias, siendo también capaz de reducir la virulencia y la translocación bacteriana, e inhibir la adherencia bacteriana a la mucosa intestinal (Marchese et al., 2000; DuPont et al., 2001; Scarpignato y Pelosini, 2005; Taylor et al., 2006; Jiang et al., 2010a; Ponziani et al., 2015; Ponziani et al., 2017). Es eficaz para el tratamiento de la diarrea del viajero y otras condiciones gastrointestinales infecciosas como la colitis por *Clostridium difficile* (Scarpignato y Pelosini, 2005; Scarpignato y Pelosini, 2006; Marchese et al., 2000). Numerosos estudios han mostrado la actividad bactericida de la rifaximina contra muchos patógenos entéricos que causan diarrea infecciosa, incluyendo *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Clostridio*, *Escherichia coli* enteroagregativa, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonela*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*, *Serratia* y *Vibrio* (Eftimiadi et al., 1984; Lamanna y Orsi, 1984; Venturini y Marchi, 1986; Hoover et al., 1993; DuPont et al., 2001; Steffen et al., 2003; Finegold et al., 2009).

La rifaximina se ha investigada y utilizada para el tratamiento de la EH durante más de 30 años (Bajaj, 2016). Se encuentra disponible en 41 países y en 2010 ha sido aprobada en Estados Unidos para reducir el riesgo de recurrencia de EH clínica o abierta (Bajaj, 2016). De Marco et al., (1984) demostraron por primera vez que la rifaximina reduce los niveles de amonio en suero y mejora los signos y síntomas neurológicos de la EH clínica en pacientes cirróticos. Posteriormente la rifaximina ha sido evaluada en numerosos estudios para el tratamiento de episodios agudos de EH y para la prevención de su recurrencia (Di Piazza et al., 1991; Pedretti et al., 1991; Bucci y Palmieri, 1993; Festi et al., 1993; Giacomo et al., 1993; Massa et al., 1993; Miglio et al., 1997; Loguercio et al., 2003; Mas et al., 2003; Paik et al., 2005; Jiang et al., 2008; Bass et al., 2010; Sharma et al., 2013; Kimer et al., 2014; Mullen et al., 2014; Bajaj et al., 2015b; Maharshi et al., 2015; Bajaj, 2016). Se ha demostrado la eficacia y la seguridad de la terapia de mantenimiento diaria con este medicamento para la prevención de la

recurrencia de EH (Mullen et al., 2014; Bass et al., 2010; Sanyal et al., 2012; Bajaj et al., 2015b; Pedretti et al., 1991; Suraweera et al., 2016). La rifaximina también mejora las capacidades operativas en pacientes con EHM, como por ejemplo la capacidad de conducir vehículos (Bajaj et al., 2011).

Varios estudios han comparado la rifaximina con otros antibióticos o con lactulosa/lactitol en el tratamiento de la EH clínica (Bucci y Palmieri, 1993; Festi et al., 1993; Massa et al., 1993; Fera et al., 1993; Paik et al., 2005; Leevy y Phillips, 2007; Bass et al., 2010; Sharma et al., 2013). La rifaximina ha demostrado ser más efectiva y segura que la lactulosa y otros antibióticos en estos pacientes (Bajaj y Riggio, 2010). Se recomienda el uso de rifaximina para la profilaxis secundaria de la EH en pacientes que han tenido episodios adicionales durante el tratamiento con lactulosa (Bass et al., 2010). La terapia combinada de rifaximina y lactulosa ha demostrado ser más efectiva que el uso de rifaximina sola (Mohammad et al., 2012). La mayoría de los estudios evaluaron una formulación de 200 mg por toma, con una dosis diaria total de 1200 mg (Di Piazza et al., 1991; Pedretti et al., 1991; Bucci y Palmieri, 1993; Festi et al., 1993; Giacomo et al., 1993; Massa et al., 1993; Miglio et al., 1997; Loguercio et al., 2003; Mas et al., 2003; Paik et al., 2005). Sin embargo, con el desarrollo de una formulación de 550 mg, estudios más recientes han evaluado la dosis de 1100 mg/día (Mullen et al., 2014; Bajaj et al., 2015b), y esta es la dosis recomendada en EE. UU. para el mantenimiento de la remisión de EH (Salix Pharmaceuticals, 2014).

La rifaximina presenta características peculiares que no son típicas de una molécula antibiótica común (Ponziani et al., 2015.) Estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos, junto con estudios preliminares en humanos (Brigidi et al., 2002; Maccaferri et al., 2010; Ridlon et al., 2013; Gao et al., 2014; Xu et al., 2014), han demostrado que la rifaximina no altera la composición general de la microbiota intestinal, pero induce cambios ligeros, como promover el crecimiento de bacterias beneficiosas para el intestino. Sin embargo, la rifaximina modula la liberación de citocinas inflamatorias (Vitali et al., 2009; Brown et al., 2010) y ejerce efectos antiinflamatorios que podrían contrarrestar la respuesta proinflamatoria observada en condiciones de alteraciones de la microbiota intestinal (Mencarelli et al., 2011). En particular, la rifaximina puede regular negativamente la respuesta inflamatoria desencadenada por los microbios intestinales inhibiendo la activación del factor nuclear NF- κ B a través del receptor X del pregnano (PXR) y reduciendo la expresión de la IL-1 β y TNF α en las células epiteliales del

intestino (Ma et al., 2007; Cheng et al., 2010; Mencarelli et al., 2010; Mencarelli et al., 2011; Hirota, 2015). Cabe destacar que existen estudios discordantes respecto al efecto de la rifaximina sobre los niveles de IL-6 o TNF α en suero; en algunos estudios se ha descrito una disminución de estas citocinas tras el tratamiento (Kalambokis et al., 2012; Mostafa et al., 2015), mientras que en otros no se ha observado ningún efecto (Gangarapu et al., 2015; Kimer et al., 2018). Mangas-Losada et al. (2019) han demostrado recientemente que la rifaximina normaliza los cambios en el sistema inmune en pacientes con EHM que mejoran la función cognitiva tras el tratamiento, pero no en los pacientes que no la mejoran. El tratamiento con rifaximina reduce el porcentaje de monocitos proinflamatorios intermedios, alcanzando niveles normales a los 6 meses en los pacientes que responden al tratamiento, y reduce el número de linfocitos T CD4⁺CD28⁻ autorreactivos a niveles casi normales en los mismos pacientes. El aumento de la activación de los linfocitos T CD4⁺ y los niveles de IL-17, CXCL13, CX3CL1, IL-22, IL-21, IL-15 e IL-18 se revierten por completo mediante el tratamiento con rifaximina en pacientes que mejoran la función cognitiva pero no en los que no la mejoran. IL-6 y CCL20 se reducen con rifaximina tanto en pacientes que mejoran como en los que no mejoran.

Por otra parte, la rifaximina reduce la virulencia bacteriana mediante la inhibición de la adhesión, de la internalización y de la translocación (Fiorucci et al., 2002; Brown et al., 2010; Jiang et al., 2010b; Schrodtt et al., 2013), y puede modificar el metabolismo bacteriano (Bajaj et al., 2013). La rifaximina puede modular la composición de la microbiota intestinal (Ponziani et al., 2017). No parece cambiar la composición de la microbiota en las heces de pacientes con EHM, y solo se ha observado una reducción en *Veillonellaceae* y un aumento en *Eubacteraceae* (Bajaj et al., 2013). Estas evidencias sugieren que la mejora en la función cognitiva y la reducción de la endotoxemia por el tratamiento con rifaximina derivan de una modulación beneficiosa del perfil metabólico de la microbiota intestinal, más que de cambios en su composición. Bajaj et al. (2013) reportaron un aumento en suero de la producción de ácidos grasos saturados e insaturados, y en la producción de fructosa, ácido succínico y ácido citramálico tras el tratamiento con rifaximina. El hallazgo más relevante fue la modificación de las redes de correlación que involucran varias bacterias (*Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Veillonellaceae*, *Porphyromonadaceae* y *Rikenellaceae*), metabolitos y resultados clínicos, sugiriendo un cambio funcional en el microbioma intestinal.

En otras patologías el tratamiento con rifaximina modula la microbiota intestinal (Ponziani et al., 2017). En pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn la rifaximina no altera la composición general de la microbiota intestinal, pero promueve el crecimiento de *Bifidobacterium*, *Atopobium* y *Faecalibacterium prausnitzii* (Brigidi et al., 2002; Maccaferri et al., 2010). Pacientes con síndrome del intestino irritable presentan un aumento en la abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* al final del tratamiento con rifaximina, sin ninguna modificación importante de la composición general de la microbiota intestinal (Soldi et al., 2015). Asimismo, en pacientes con diferentes enfermedades gastrointestinales, la abundancia de *Lactobacillus* aumenta tras un mes de tratamiento con rifaximina, mientras que no se observa ninguna modificación de la composición general de la microbiota intestinal (Ponziani et al., 2016; Xu et al., 2014). En conclusión, la rifaximina puede aumentar la abundancia de bacterias intestinales beneficiosas, y al mismo tiempo mantiene estable la composición general de la comunidad microbiana intestinal. Los miembros de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Atopobium* y *Collinsella* pueden desarrollar mecanismos de resistencia tras la exposición a la rifaximina, pudiendo crecer a concentraciones altas de este antibiótico (Finegold et al., 2009; Gillis y Brogden, 1995). Tras la exposición a rifaximina, se han descrito en *Bifidobacterium infantis* mutaciones *missense* en la región central del gen *rpoB*, que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (Vitali et al., 2007; Vitali et al., 2008). Por lo tanto, en el caso de la rifaximina, la adquisición de resistencia por géneros de bacterias beneficiosos puede representar una ventaja para el huésped en lugar de una consecuencia perjudicial (Ponziani et al., 2017).

Además de la modulación favorable de la microbiota intestinal, la rifaximina presenta otras características que hacen que su uso sea seguro en la práctica clínica (Ponziani et al., 2017). La rifaximina es escasamente absorbida, y tras de la administración oral se encuentra en una concentración insignificante en la orina (Ponziani et al., 2017). Esta característica es típica de la formulación de marca del medicamento (xifaxan), que contiene solo cristal polimorfo- α , mientras que se ha demostrado una mayor biodisponibilidad sistémica para la formulación genérica que contiene una forma amorfa de la molécula (Blandizzi et al., 2014). La rifaximina también ha demostrado ser segura en sujetos de edad avanzada (Bass et al., 2010) y niños (Scarpellini et al., 2013). Sin embargo, en modelos animales se han demostrado efectos teratogénicos en el feto, y los beneficios de la rifaximina en mujeres embarazadas deben sopesarse frente a este riesgo

(Ponziani et al., 2017). La incidencia de infecciones también es baja, y los pocos casos de colitis por *C. difficile* notificados durante el tratamiento con rifaximina generalmente se asocian con condiciones que predisponen a ello, como la hospitalización y el uso prolongado de antibióticos (Ponziani et al., 2017).

El aumento de bacterias beneficiosas para el intestino asociado con el tratamiento con rifaximina, junto con sus propiedades adicionales y su acción local, respaldan razonablemente una reclasificación de esta molécula, que puede definirse no solo como un antibiótico sino también como un "eubiótico", es decir, un modulador positivo del ecosistema intestinal (Ponziani et al., 2017).

6. Modelos animales de encefalopatía hepática crónica

El uso de modelos animales de EH permite estudiar los mecanismos que inducen el deterioro cognitivo y motor y diseñar y ensayar posibles tratamientos terapéuticos para revertirlos. Los modelos animales de EH no sólo presentan hiperamonemia y neuroinflamación, sino que también reproducen muchas de las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en pacientes.

Los modelos más utilizados son: la cirugía de anastomosis porta-cava, la cirugía de ligadura biliar y el modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático.

La cirugía de anastomosis porta-cava (PCS) se realiza seccionando la vena porta, principal aporte sanguíneo al hígado y ensamblándola con la vena cava. De esta manera, la sangre proveniente del intestino no circula a través del hígado, que por lo tanto no puede proceder a la desintoxicación de sustancias nocivas, entre estas el amoníaco. Como consecuencia, tras la anastomosis porta-cava se produce hiperamonemia. Las ratas PCS presentan alteraciones en ritmos circadianos (Bengtsson et al., 1986; Steindl et al., 1996) y en el sueño (Hernandez-Viadel et al., 2003), alteraciones motoras como hipoquinesia (Rodrigo et al., 2007) e incoordinación motora (Dadsetan et al., 2016a; Agustí et al., 2017), alteraciones cognitivas como disminución de la memoria y la capacidad de aprendizaje (Elizondo et al., 2007; Rodrigo y Felipe, 2007; Rougier et al., 2007; Méndez et al., 2008; Hernández-Rabaza et al., 2015; Dadsetan et al., 2016b) y neuroinflamación (Cauli et al., 2007a).

La cirugía de ligadura biliar (BDL, Bile duct-ligation) induce fallo hepático mediante la obstrucción del conducto biliar a través de una o varias ligaduras, impidiendo

totalmente el flujo de bilis al intestino. Las ratas BDL presentan hiperamonemia (Rodrigo et al., 2005), ictericia e hipertensión portal (Kountouras et al., 1984), fibrosis que progresa a cirrosis, translocación bacteriana y disfunción del sistema inmune (Roughneen et al., 1986; Greve et al., 1990; Aronson et al., 1993; Jover et al., 2006). También presentan alteraciones cognitivas y motoras (De Flora et al., 1996; Marchi y Raiteri, 1996) asociadas a neuroinflamación (Rodrigo et al., 2010).

El modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático se desarrolló a finales de los años 80 en nuestro laboratorio (Felipo et al., 1988a; Azorín et al., 1989). Consiste en administrar a las ratas una dieta que contiene acetato amónico (25% p/p), lo cual produce un estado de hiperamonemia crónica moderada en la que los niveles de amonio en sangre son aproximadamente el doble que en las ratas control. Este modelo reproduce muchas de las alteraciones presentes en la encefalopatía hepática y permite discernir qué alteraciones cerebrales y neurológicas son debidas a la hiperamonemia y cuales son debidas a otros factores asociados al fallo hepático. Es un modelo sencillo y permite mantener hiperamonemia sostenida durante largos periodos de tiempo sin alterar la función hepática. Se ha empleado para estudiar el efecto de la hiperamonemia crónica sobre la función cognitiva (Aguilar et al., 2000; Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016aa y 2016b) y motora (Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016b), para investigar los mecanismos responsables de las alteraciones cognitivas y motoras, incluyendo la función de vías de transducción de señales en cerebro in vivo (Hermenegildo et al., 1998) y para evaluar la utilidad de distintos tratamientos terapéuticos para revertir el deterioro cognitivo y motor (De Flora et al., 1996; Erceg et al., 2005a; 2005b). Rodrigo et al. (2010) demostraron por primera vez que la hiperamonemia es capaz por si sola de inducir neuroinflamación, sin que sea necesaria la existencia de fallo hepático. Las ratas hiperamonémicas tratadas con fármacos que reducen la neuroinflamación recuperan su función motora (Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016a) y cognitiva (Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016a y 2016b).

Aunque estos modelos reproducen las alteraciones cognitivas y motoras características de la EH y permiten investigar los mecanismos implicados y evaluar el efecto de tratamientos terapéuticos, ninguno de ellos reproduce las fases del daño hepático (esteatosis, esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis) que se produce en los pacientes. Por esta

razón por esta tesis hemos elegido el modelo de ratas con fallo hepático progresivo inducido por tetracloruro de carbono.

6.1 Modelo de ratas con fallo hepático progresivo inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄)

El tetracloruro de carbono (CCl₄) ha sido ampliamente utilizado como solvente, limpiador y desengrasante, tanto a nivel industrial como doméstico. El cloroformo fué el principal anestésico durante muchos años, y el yodoformo fué muy utilizado como antiséptico. Ambos compuestos contienen CCl₄, y se dejaron de usar tras el descubrimiento de sus pronunciadas hepatotoxicidad y carcinogenicidad para los sujetos expuestos (Weber et al., 2003). Actualmente, el CCl₄ es muy utilizado como modelo experimental para el estudio de efectos del daño hepático y de sus mecanismos, ya que produce daño hepático en muchas especies, incluidos los primates no humanos y las ratas (Slater, 1981; Kumar et al., 1972; Yoshida et al., 1999; Carlson et al.; 1975).

La administración única o repetida del CCl₄ es uno de los modelos experimentales más utilizados para inducir fibrosis hepática (Scholten et al., 2015). La toxicidad aguda del CCl₄ ha sido bien establecida. En ratas la dosis letal (LD)₅₀ tras la absorción oral aguda está en el rango de 4.7-14.7 ml por kg de peso corporal, dependiendo de las condiciones nutricionales y los suplementos administrados (McLean y McLean, 1966; Pound et al., 1973). Una dosis oral única de CCl₄ en aceite de maíz induce aumento del peso del hígado, niveles elevados de grasa, urea sérica, actividad de enzimas hepáticos y clara evidencia histopatológica de daño hepático con necrosis celular (Korsrud et al., 1972). Por otro lado, la exposición oral a largo plazo a CCl₄ causa una marcada hepatotoxicidad que conduce a fibrosis, proliferación de las células epiteliales de las vías biliares, cirrosis e incluso carcinoma hepatocelular (National Cancer Institute, 1976).

La toxicidad del CCl₄ presenta distintas fases. Las primeras dos o tres semanas se caracterizan principalmente por una necrosis de los hepatocitos, como indican las actividades crecientes en sangre de enzimas específicas del hígado (e.g. transaminasas) y valores decrecientes de pseudocolinesterasa, una colinesterasa no específica cuya disminución se usa como marcador diagnóstico de daño hepático (Dhungana et al., 2017). Durante las siguientes dos o tres semanas se produce una acumulación masiva de grasa hepática, los niveles séricos de triglicéridos y aspartato aminotransferasa

aumentan y la función hepática se reduce. Durante la tercera fase, el aumento de aspartato aminotransferasa continúa, se elevan los niveles de hidroxiprolina y triglicéridos, y la función hepática disminuye aún más. En la fase final, los valores de pseudocolinesterasa disminuyen aún más y se observa atrofia del hígado. Esto puede combinarse con disminución de albúmina sérica y pérdida de peso, indicadores de una pérdida progresiva de la función hepática durante la fibrogénesis prolongada que conduce en sus etapas finales a cirrosis (Paquet y Kamphausen, 1975).

El CCl_4 es metabolizado en el hígado al radical triclorometilo (CCl_3^*) por la superfamilia de monooxigenasas del citocromo cromosómico P450. Este radical reacciona con ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, alterando procesos celulares clave y el metabolismo de los lípidos (degeneración grasa y esteatosis) y proteínas. La formación de radicales triclorometilperoxi (CCl_3OO^*) mediante la oxigenación del CCl_3^* , induce peroxidación de lípidos y destrucción de ácidos grasos poliinsaturados. Como consecuencia disminuye la permeabilidad de la membrana en todos los compartimentos celulares (mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana plasmática), y se produce daño hepático generalizado (Scholten et al., 2015) (Figura 17).

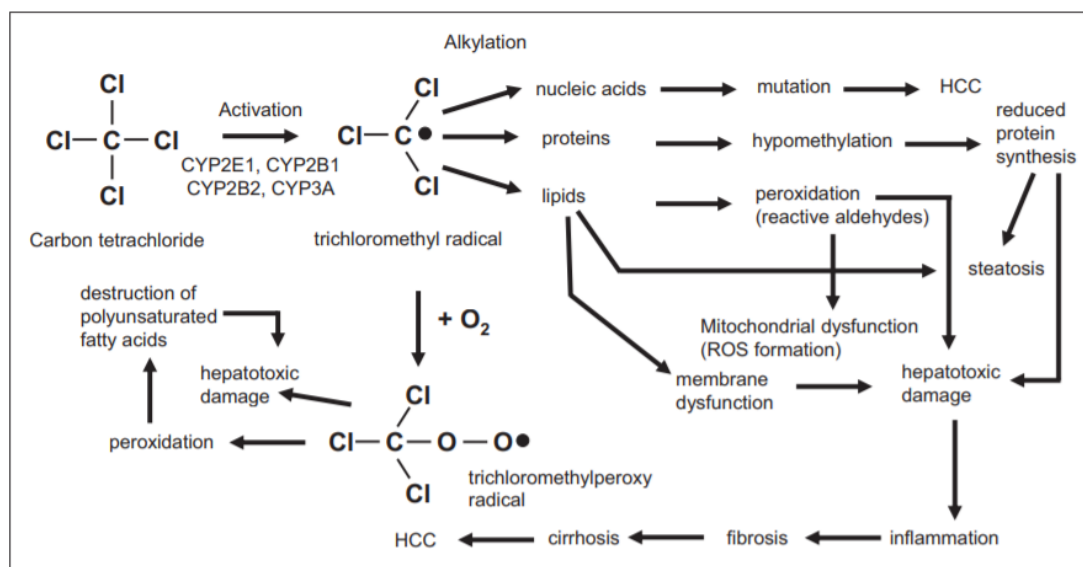


Figura 17. Secuencia de eventos durante el daño hepático inducido por CCl_4 . (Scholten et al., 2015).

El CCl_4 tiene una baja toxicidad sistémica a nivel del peritoneo, la mucosa, las vías respiratorias y sistema nervioso central (Davis, 1934; Scholten et al., 2015). Las respuestas al CCl_4 , incluido el grado de fibrogénesis, pueden modularse variando los

intervalos de administración y la duración del tratamiento. La administración intraperitoneal (IP) de CCl₄ en ratones C57BL/6 dos veces por semana durante seis semanas, o alternativamente tres veces por semana durante cuatro semanas, da como resultado fibrosis. En cepas altamente susceptibles, cuatro semanas de aplicación de CCl₄ suelen ser suficientes para la inducción de fibrosis, mientras que en cepas resistentes a la fibrosis, la menor susceptibilidad puede compensarse mediante un tratamiento más prolongado de hasta 12 semanas (Scholten et al., 2015). El CCl₄ puede administrarse mediante inyección IP, inhalación o sonda gastroesofágica. La mayoría de los investigadores prefieren la aplicación IP por razones de excelente reproducibilidad, buenas tasas de supervivencia, facilidad de rendimiento y seguridad (Scholten et al., 2015).

Para el desarrollo de esta tesis se ha elegido el modelo de ratas inyectadas intraperitonealmente con CCl₄ disuelto al 10% en aceite de maíz, a la dosis de 1 ml/kg administrado 3 veces por semana, con el fin de inducir daño hepático crónico y poder evaluar la evolución de la EH conforme progresa el fallo hepático. Para ello se han analizado los distintos parámetros a distintos tiempos de administración de CCl₄, en las etapas de esteatosis, esteatohepatitis leve, esteatohepatitis avanzada y cirrosis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se detalla en la introducción, pacientes con enfermedades hepáticas crónicas como esteatohepatitis no alcohólica pueden presentar deterioro cognitivo antes de llegar a cirrosis si la hiperamonemia y la inflamación periférica son lo suficientemente elevadas. Estos dos factores son suficientes para inducir neuroinflamación y deterioro cognitivo leve incluso en ausencia de cirrosis. Una de las primeras áreas cerebrales afectada es el cerebelo, en el que la neuroinflamación se produce en las primeras etapas del daño hepático, incluso antes de llegar a cirrosis, y puede ir asociada a la infiltración de linfocitos periféricos.

En ratas con encefalopatía hepática, la neuroinflamación altera la neurotransmisión en hipocampo y cerebelo conduciendo a las alteraciones cognitivas y motoras.

Aunque la literatura evidencia que el tratamiento con rifaximina mejora la función cognitiva en un porcentaje importante de pacientes, se desconocen los mecanismos implicados.

En base a estos datos, proponemos las siguientes:

HIPÓTESIS

1. En ratas con fallo hepático crónico la inflamación periférica conduce a neuroinflamación, que altera la neurotransmisión, induciendo las alteraciones cognitivas y motoras características de la encefalopatía hepática.
2. Este proceso puede ocurrir tanto en ratas como en pacientes con esteatohepatitis, antes de llegar a cirrosis, y un tratamiento temprano podría prevenirlo.
3. La inducción de neuroinflamación por la inflamación periférica en ratas con daño hepático podría estar mediada por la infiltración de linfocitos en cerebro.
4. Los mecanismos por los que la neuroinflamación altera la neurotransmisión en hipocampo y cerebelo y la función cognitiva y motora en ratas con daño hepático podrían implicar cambios en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica.
5. El tratamiento con rifaximina podría normalizar la inflamación periférica y prevenir la infiltración de linfocitos en cerebro, la neuroinflamación y las alteraciones en la neurotransmisión, restableciendo la función cognitiva y motora en ratas con daño hepático.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis son, en ratas con distintos grados de fallo hepático:

1. Caracterizar las alteraciones cognitivas y motoras.
2. Caracterizar la neuroinflamación en hipocampo y cerebelo y evaluar si el tratamiento con rifaximina la previene.
3. Analizar los mecanismos por los que se altera la neurotransmisión: papel de los cambios en la expresión en membrana de receptores y transportadores de glutamato y GABA en hipocampo y cerebelo y en los niveles extracelulares de glutamato y GABA en cerebelo.
4. Evaluar si el tratamiento con rifaximina previene las alteraciones en la expresión en membrana de los receptores AMPA y/o NMDA en hipocampo y el deterioro de la memoria espacial y de reconocimiento.
5. Evaluar si el tratamiento con rifaximina previene las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica en cerebelo y en los mecanismos que la modulan y el deterioro del aprendizaje en el laberinto en Y y de la coordinación motora.
6. Caracterizar la inflamación periférica, el inmunofenotipo y la infiltración de células del sistema inmune en cerebro.
7. Analizar si el tratamiento con rifaximina previene o revierte la inflamación periférica, los cambios en el inmunofenotipo y la infiltración de células del sistema inmune en cerebro.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y diseño experimental

Se inyectaron intraperitonealmente ratas Wistar macho (150-180 g) (1 ml/kg de peso corporal) 3 veces/semana durante 12 semanas con tetracloruro de carbono (CCl_4) al 10% en aceite de maíz para inducir daño hepático progresivo y obtener un modelo animal de cirrosis hepática (Lee et al, 2005). Las ratas control fueron inyectadas intraperitonealmente con aceite de maíz. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) de nuestro Centro y por la Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana y se realizaron de acuerdo con las directrices de la Directiva de la Comisión Europea (2010/63 / UE) para el cuidado y manejo de animales experimentales.

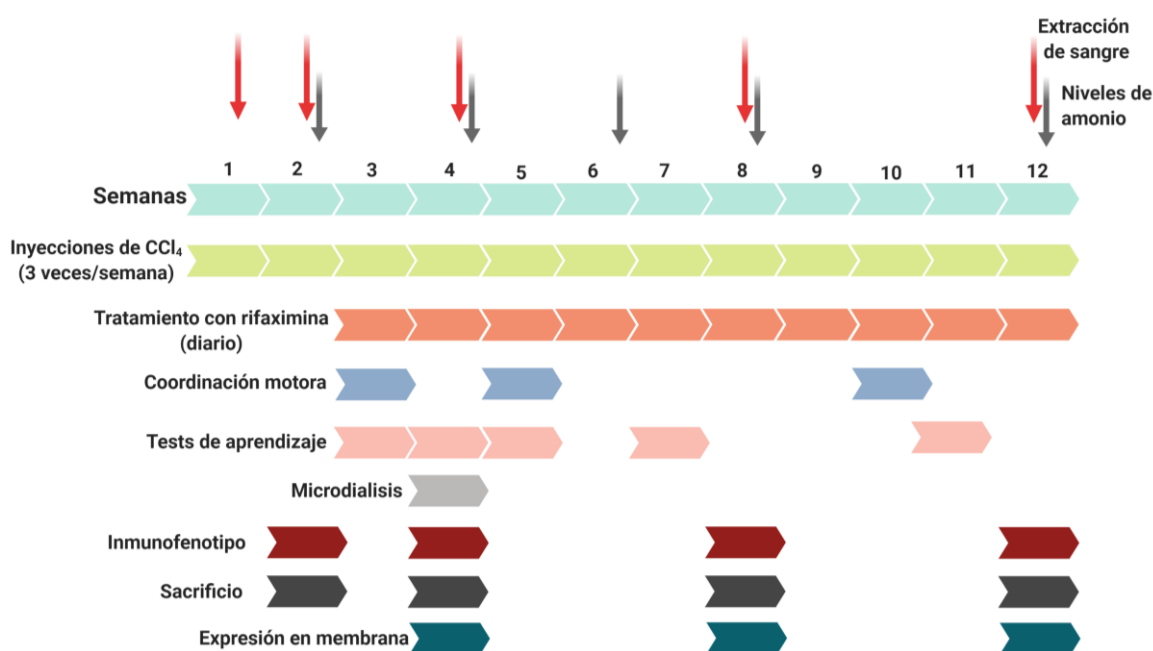


Figura 18. Diseño experimental.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos: control, control + rifaximina, CCl_4 y CCl_4 + rifaximina. La rifaximina (Sigma) se disolvió en etanol al 100% y se administró por vía oral (20 mg/kg de peso corporal) una vez al día hasta el sacrificio. El tratamiento con rifaximina comenzó 1 o 2 semanas después de la primera inyección de CCl_4 . A las ratas de los grupos control y CCl_4 se les administró por vía oral etanol al 100%. El número de ratas utilizadas para analizar cada parámetro se indica en la leyenda de la figura correspondiente. Las ratas se sacrificaron a las semanas 2, 4, 8 y 12 de iniciar las inyecciones de CCl_4 para analizar los efectos de diferentes grados de daño hepático.

2. Análisis histológico del daño hepático

Ratas pertenecientes a los 4 grupos (control, control + rifaximina, CCl₄ y CCl₄ + rifaximina) se sacrificaron a distintos tiempos (tras 2, 4, 8 o 12 semanas de inyección de CCl₄). Las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital (1 ml/kg) y se perfundieron por vía intracardiaca con suero salino para eliminar la sangre. A continuación, para fijar los tejidos se perfundió con 500 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M (Ph 7.4) a temperatura ambiente. Se extrajeron cuidadosamente los hígados y se mantuvieron en PFA durante un periodo no superior a 24 horas, tras el cual se guardaron en una solución de PB 0.1 M conteniendo azida sódica al 0.01%. A continuación, el hígado se incluyó en parafina y se cortaron secciones horizontales de 5 µm utilizando un micrótopo. Para desparafinar las muestras se incubaron los cortes 1 hora a 62°C. El grado de esteatosis, de inflamación lobular y de fibrosis se estableció con tinciones de hematoxilina-eosina y tricromo de Masson. La tinción hematoxilina-eosina se realizó con el Autostainer XL (Leica), mientras que el tricromo de Masson fue realizado por el Instituto Valenciano de Patología (IVP) de la Universidad Católica de Valencia (UCV). La esteatohepatitis fue evaluada usando una versión más simple del sistema de puntuación propuesta por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y del Riñón NASH Clinical (Kleiner et al., 2005). Las características histológicas se agruparon en cuatro grandes categorías: esteatosis, inflamación, fibrosis y lesión hepatocelular. La puntuación se definió como la suma no ponderada de las puntuaciones para el grado de esteatosis (0-3), la localización de esteatosis con respecto a la vascularización del ácino hepático (0-3, asignando la puntuación más alta a la localización más cercana al aporte sanguíneo), la inflamación lobular (0-3), el estadio de fibrosis (0-3) y la presencia de necrosis (0- 1); las ratas que puntuaron entre 3-6 se clasificaron como esteatohepatitis leve, entre 7-9 se clasificaron como esteatohepatitis más severa y las ratas con una puntuación >9 se clasificaron como cirróticas.

3. Determinación de los niveles de amonio en plasma

La muestra de sangre (20 µl) se obtuvo por punción de la vena safena. El amonio se midió inmediatamente después de la toma de sangre con el kit “Ammonia Test Kit II” distribuido por PocketChemBA system (Arkay, Inc., Kyoto, Japan).

4. Ensayos de coordinación motora

4.1 Rotarod

El *Rotarod* (Ugo Basile) es un cilindro de 8.5 cm de largo y 5 cm de diámetro, que gira con una determinada aceleración (Figura 19). Antes de efectuar el test se colocaron los animales sobre el cilindro a una velocidad mínima continua para que se habituaran. Cuando ya se observó una disminución del estrés ocasionado (intentar escapar, darse la vuelta, etc), se devolvieron a sus jaulas y se esperó 1 ó 2 minutos. Se volvieron a poner sobre el cilindro en el sentido opuesto al movimiento de éste. La velocidad se fue acelerando desde 4 a 40 rpm, hasta un máximo de 5 min. Se midió el tiempo de permanencia de cada animal en el rotarod antes de caerse. Cuanto más tiempo permanecen las ratas sobre el *rotarod* mejor coordinación motora presentan (Hamm et al, 1994).

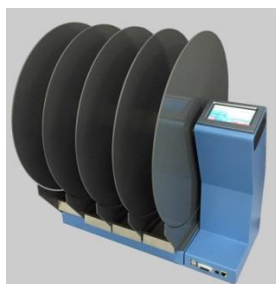


Figura 19. Rotarod.

4.2 Beam walking

El test del *beam walking* mide coordinación motora y equilibrio. Consiste en hacer pasar a la rata por un listón de 1 metro de longitud y 20 mm de anchura, situado a aproximadamente 1 metro del suelo, hasta alcanzar en el final del recorrido una caja cerrada y oscura, que proporciona un ambiente agradable para los roedores (Figura 20). Antes de realizar el test se entrenó a las ratas haciéndolas pasar tres veces por el listón dejándolas dentro de la caja final (unos 2 minutos) para que se sintieran protegidas. Algunas ratas necesitaron más ensayos y otras, por miedo, no pasaron el listón (éstas ratas se eliminaron del estudio). Se midió el número de resbalones que el animal tiene durante el recorrido por el listón. Mayor número de resbalones indica mayor incoordinación motora.



Figura 20. Beam walking.

5. Tests de aprendizaje y memoria

Con las ratas pertenecientes a los cuatro grupos, se realizaron diferentes test con el fin de evaluar distintas habilidades cognitivas.

5.1 Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y

Este test se realizó en un laberinto de madera de tres brazos idénticos en forma y longitud (60 cm de largo, 11.5 cm de ancho y 25 cm de altura) colocados en forma de Y (Figura 21). Uno de los brazos se eligió como salida y los otros dos fueron considerados los brazos de elección. El color de las paredes del laberinto podía ser blanco o negro. Dependiendo del color del laberinto se colocaron los “pellets” de comida (Dutless Precision Pellets®, Rodent Purified Diet, Bio-Serv) en la parte más distal de uno u otro brazo de elección. Cuando el laberinto era negro se colocaban los pellets al final de brazo derecho. Cuando el laberinto era blanco se colocaban los pellets al final del brazo izquierdo. El animal tenía que aprender donde estaba el pellet en función del color del laberinto. La realización de este test requiere un período de familiarización del animal con el laberinto (habitución durante 4 días) y una restricción de comida (unos 8 gramos al día) durante el tiempo de habituación y de test para que el refuerzo en forma de comida tenga el efecto esperado.

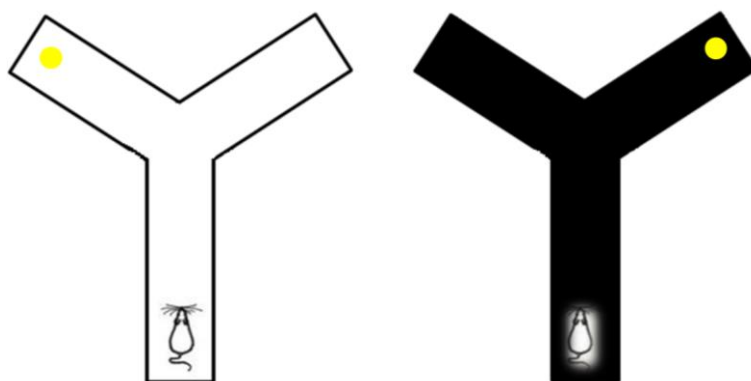


Figura 21. Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y.

El día 1 de habituación se dejó explorar a las ratas (de 2 en 2) durante 10 minutos con la comida esparcida por todo el laberinto blanco. El segundo día se pusieron las ratas de una en una en el laberinto negro para que exploraran con comida esparcida por todo el laberinto. El día 3 las ratas se colocaron en el laberinto de una en una durante 5 minutos y la comida se situó en los extremos distales de los dos brazos de elección siendo el laberinto de color blanco. En el cuarto día la habituación fue como el tercer día pero con el laberinto negro.

El test se repite diez veces cada día cambiando de forma aleatoria el color de las paredes, y se considera que el animal ha aprendido cuando acierta los 10 ensayos seguidos en un mismo día. Un acierto consiste en que el animal escoge el brazo derecho y come los pellets colocados al final del mismo, en el caso de que el laberinto sea negro. En el caso de que el laberinto sea blanco, el animal escoge el brazo izquierdo. Cada vez que una rata se somete al test se deja como máximo 3 minutos en el laberinto durante los cuales o bien realiza un acierto, un error o bien un no ensayo (se queda en el brazo de salida). Si a los 25 días de la realización del test la rata no ha aprendido ya no se hacen más tests considerando que el animal no es capaz de aprender la tarea.

5.2 Análisis de la función cognitiva en el laberinto radial de 8 brazos

Este laberinto permite cuantificar el aprendizaje y la memoria espacial de las ratas, descomponiéndola además en dos procesos cognitivos diferenciados: memoria espacial de referencia y memoria espacial de trabajo.

El test se lleva a cabo en un laberinto con un área central de unos 30 cm de diámetro en la cual confluyen ocho brazos equidistantes y de idéntico tamaño: 70 cm de longitud y

10 cm de anchura. El laberinto empleado es de plexiglás negro y está a una altura de 1 metro sobre el suelo. Cada brazo tiene paredes laterales con una altura de 5 cm en el extremo distal y de 30 cm en el extremo más próximo al área central. Además, en el extremo distal de cada brazo hay un comedero empotrado en el suelo donde se coloca la comida empleada como recompensa (Figura 22). Con el fin de que presenten el nivel de motivación necesario para realizar la tarea, a las ratas se les reduce la ingesta de comida cuatro días antes de realizar la habituación y se mantienen con esa dieta restringida durante toda la duración del test. En cualquier caso, se controla el peso de los animales para que la pérdida de peso nunca sobrepase un 20%.

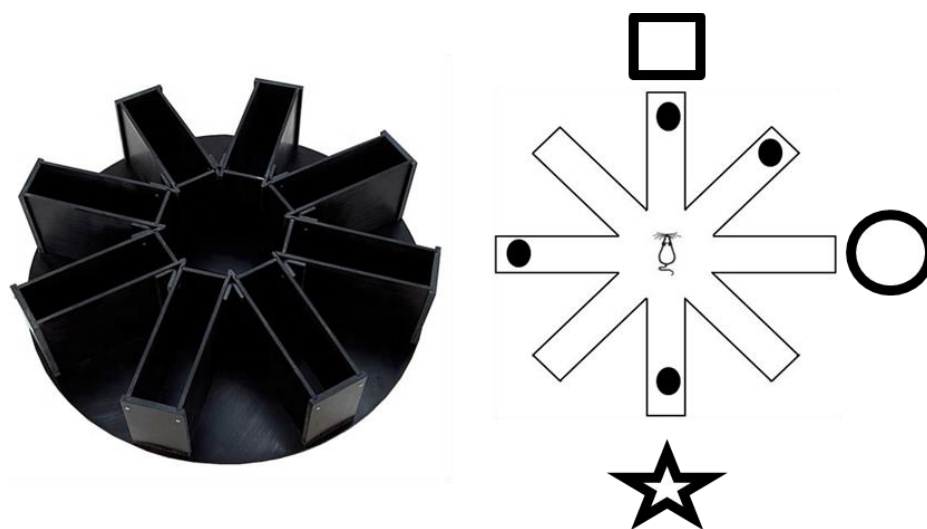


Figura 22. Laberinto radial de 8 brazos. A la izquierda, una imagen del laberinto empleado. A la derecha, un esquema del test llevado a cabo. El animal se coloca en el centro del laberinto y a lo largo del test aprende a localizar y recordar los 4 brazos que contienen comida al final, usando como puntos de referencia las pistas visuo-espaciales dispuestas a su alrededor.

En primer lugar, se lleva a cabo la habituación de las ratas, tanto al investigador como al laberinto y a la recompensa. En una primera sesión se colocan dos ratas en el laberinto durante 5 min con comida “*pellet*” (Dutless Precision Pellets®, Rodent Purified Diet, Bio-Serv) esparcida por todo el laberinto. En una segunda sesión se coloca sólo una rata en el laberinto durante 5 minutos con comida únicamente dentro de todos los comederos (2 *pellets*). A continuación, se realiza el test durante 5 días realizando 3 ensayos al día. Se coloca la comida en 4 de los 8 comederos: en 2 brazos consecutivos (ejemplo: 1 y 2) y en otros 2 brazos no consecutivos (ejemplo: 4 y 6). El patrón de brazos con/sin comida es diferente para cada rata y se mantiene idéntico a lo largo de los 5 días. Se espera que la rata sea capaz de orientarse espacialmente, mediante las pistas visuales colocadas en la sala de experimentación, aprenda qué brazos contienen comida y se

coma todos los pellets pero, en cualquier caso, el tiempo máximo de estancia en el laberinto es de 3 min. Durante el test se registran (i) los errores de referencia espacial, que se definen como el número de veces que el animal entra en un brazo sin comida; (ii) los errores de memoria de trabajo, el número de veces que entra en un brazo que ya ha visitado dentro de un mismo ensayo y (iii) el número de aciertos en cada ensayo, que corresponde al número de entradas en brazos con comida. Restando a este número de aciertos el número de errores de referencia se obtiene el índice de aprendizaje espacial.

5.3 Tests de reconocimiento de objetos: reconocimiento de objeto nuevo (NOR) y de nueva localización de objeto (NOL)

La memoria de reconocimiento, en los roedores, se basa en la capacidad de recordar un estímulo que ya ha sido percibido con anterioridad, diferenciándolo de otro novedoso. En esta tesis se han analizado dos variantes de la memoria de reconocimiento: (i) reconocimiento de un objeto novedoso (*Novel Object Recognition*, NOR) y (ii) reconocimiento de una localización espacial novedosa (*Novel Object Location*, NOL). En ambos casos, el test se realizó en una caja de madera (70x70x40 cm) pintada de negro, con el suelo cubierto de serrín, pistas visuo-espaciales en las paredes y una videocámara colocada encima para la grabación y posterior análisis del comportamiento de los animales. Los animales fueron habituados a este nuevo entorno durante 5 días, dejándolos que exploraran libremente la caja vacía durante 5 min cada día. Al sexto día, se llevó a cabo el NOL, que constó de una primera fase de muestra y una segunda fase de test. En la fase de muestra, sobre el serrín se colocaron dos objetos idénticos, contruidos por nosotros mismos a partir de pequeños bloques de madera pintada. La posición de los objetos se cambió entre unos animales y otros para descartar sesgos debidos a estímulos externos. Tras explorar libremente los objetos durante 3 min, el animal se devolvió a su caja para esperar en ella durante 2 h. A continuación, se llevó a cabo la fase de test, colocando uno de los objetos anteriormente explorados en un sitio diferente de la caja para permitir luego que el animal volviera a explorar libremente en ella durante 3 min (Figura 23A).

El séptimo día se llevó a cabo el test NOR. En este caso, de nuevo, hubo una primera fase de muestra y una segunda fase de test. En la fase de muestra, sobre el serrín se colocaron dos objetos idénticos. La posición de los objetos se cambió entre unos animales y otros para descartar sesgos debidos a estímulos externos. Tras explorar

libremente los objetos durante 3 min, el animal se devolvió a su caja para esperar en ella durante 6 h. A continuación, se llevó a cabo la fase de test, sustituyendo uno de los objetos anteriormente explorados por un nuevo objeto, diferente a los dos iniciales, para permitir luego que el animal volviera a explorar libremente en ella durante 3min (Figura 23B).

En el análisis posterior de los vídeos de los tests se analizó el tiempo que los animales exploraban el estímulo nuevo (el objeto cambiado de sitio en el NOL y el nuevo objeto en el NOR) frente al estímulo ya conocido. De esta forma, se define el ratio de discriminación como el cociente entre la resta del tiempo de exploración del estímulo nuevo y el tiempo de exploración del estímulo conocido dividida por el tiempo total de exploración.

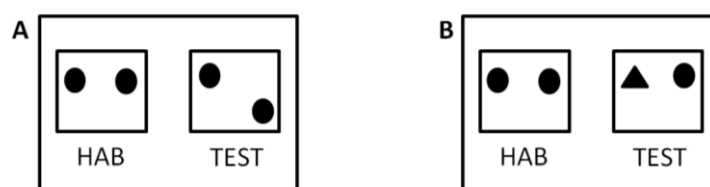


Figura 23. Tests de reconocimiento A) de nueva localización de objeto (NOL) y B) de objeto nuevo (NOR). Se representa la configuración de los objetos a explorar por el animal en la fase de test del NOL (A), en la que se ha cambiado la posición de uno de los objetos, y del NOR (B), en la que se ha sustituido uno de los objetos por otro diferente. En la imagen de la izquierda se representan los objetos durante la fase de habituación y en la derecha durante el test.

6. Microdiálisis in vivo en el cerebelo

Esta técnica permite recoger líquido extracelular en un área concreta del cerebro, en el cual analizar posteriormente neurotransmisores y otros metabolitos, mientras las ratas están despiertas y moviéndose libremente.

Las ratas se anestesiaron con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla). Se colocó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar en el cerebelo la guía de microdiálisis (MD-2251, Omega-ring Intracerebral Guide Cannula and Stylet, 6/pkg. BASi). Se realizó una incisión sagital de aproximadamente 2.5 cm para dejar la superficie del cráneo al descubierto y con ayuda de una espátula, suavemente, se raspó para quitar el tejido conectivo y de este modo permitir posteriormente una buena adhesión del cemento dental a la superficie del cráneo. A continuación, se marcaron las coordenadas de introducción de la guía en el cerebelo: -10.5 mm anteroposterior, -1.6 mm medio lateral y 0.8 mm dorsoventral respecto al bregma (Paxinos y Watson, 2007). Se realizaron dos perforaciones (1 mm de

diámetro) para insertar dos tornillos de sujeción al cráneo y un agujero (1 mm de diámetro) que permitió el acceso vertical de la guía al cráneo. La guía se sujetó al cráneo mediante los tornillos y cemento dental. Después se suturó la piel y se devolvieron las ratas individualmente a sus jaulas durante un periodo de 48-72 horas hasta el momento de realizar la microdialísis cerebral.

Para realizar la microdialísis se implantó una sonda (CMA/12; 3mm de longitud). Se perfundió continuamente a través de la sonda líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a un flujo de 3 μ L/minuto mediante una bomba de microperfusión (BAS, Analytical Systems, Inc, USA). La composición del LCA era NaCl 145 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 2.26 mM, tamponado a pH 7.4 con tampón fosfato 2 mM (Hermenegildo et al., 1998). El LCA se filtró con filtros Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro. Transcurridas 2 horas se recogieron muestras cada 30 minutos (90 μ L de dializado en cada muestra). Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido para ser posteriormente almacenadas a -80°C hasta el momento de ser analizadas.

6.1 Determinación de GABA y glutamato en muestras de microdialísis en cerebelo in vivo por cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS)

La concentración de GABA y glutamato se midió por cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS) en las muestras recogidas por microdialísis in vivo en el cerebelo.

La cromatografía se realizó en un sistema de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (LC EXION) con una columna Atlantis HILIC Silica (3,0 micras i.d., 100 mm x 2,1 mm) (Waters). La fase móvil estaba compuesta de 0.1% de ácido fórmico en agua (A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). El programa de gradiente consistió en: 90% A 0–1.5 min, 15% A a 1.7 min, 15% A 3 min; 90% A 3.1 min y 90% A 4.5 min. La velocidad de flujo era de 0,4 ml/min; la temperatura de la columna 30 °C y el volumen de inyección 30 μ L. El HPLC se acopló a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo QTRAP 4500 (AB Sciex, Ontario, Canadá) equipado con una fuente de iones de ionización por electropulverización (ESI) que fue utilizado en modo de iones positivos. Las condiciones fueron: potencial de entrada 10, gas cortina 20, potencial de desagrupación 46 V, Energía de colisión 15 eV, GAS1 40 y GAS2 30, 600 °C y 4500 V en modo monitorización de reacción múltiple (MRM) con la siguiente transición para la

cuantificación de glutamato $148\ m/z > 84\ m/z$ (potencial de desagrupación 41 V, energía de colisión 21 eV) y GABA $104\ m/z > 87\ m/z$ (potencial de desagrupación 46 V, energía de colisión 15 eV). Una curva estándar de cada compuesto (GABA y glutamato (SIGMA) en LCA se utilizó para calcular la concentración de éstos en las muestras con el software Analyst, versión 1.6.3. de SCIEX.

7. Análisis de la expresión en membrana de subunidades de transportadores y receptores de neurotransmisores en cerebelo e hipocampo

Ratas pertenecientes a los 4 grupos (control, control + rifaximina, CCl₄ y CCl₄ + rifaximina) se sacrificaron por decapitación a distintos tiempos (tras 4, 8 o 12 semanas de inyección de CCl₄). Se extrajo rápidamente el cerebro y se colocó sobre una placa Petri enfriada en hielo. Se llevó a cabo la disección del cerebelo y de los hipocampos, que fueron inmediatamente sumergidos en tampón Krebs (en mM: NaCl 119, KCl 2.5, KH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26.2, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11) enfriado en hielo y burbujeado con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), con el fin de mantener el tejido fresco y oxigenado y el metabolismo ralentizado para disminuir el riesgo de necrosis. Los hipocampos se cortaron longitudinalmente en rodajas de 400 µm de grosor mediante un *chopper* manual, mientras que para el cerebelo se hicieron cortes transversales de 400 µm en un vibratomo (LEICA, Vt1000s). Las rodajas se emplearon para analizar la expresión de determinadas proteínas en la membrana celular. Para ello, los cortes se incubaron con *bis-sulfosuccinimidyl-suberate* (BS3) (Pierce cat# 21580, Rockford, IL, USA), una molécula *cross-linker* que no es capaz de cruzar la membrana celular y que se une a los residuos de lisina en los dominios extracelulares de las proteínas formando agregados de las mismas. Las rodajas se transfirieron a tubos con 200 µl de Krebs, (muestras (-)), o con 200 µl de BS3 2 mM en Krebs, (muestras (+)), y se incubaron en ambos casos durante 30 min a 4°C y en agitación. Tras este tiempo, la reacción de *cross-linking* se finalizó añadiendo 200 µl de glicina 100 mM en Krebs a todos los tubos. Se incubó durante 10 min para neutralizar el BS3 que hubiera podido quedar sin unirse a proteínas de membrana. De esta forma queda garantizado que sólo las proteínas de membrana permanecerán unidas al *cross-linker* y que los restos de BS3 que hayan podido quedar no se unirán a proteínas intracelulares cuando, a continuación, se homogenicen las

muestras mediante sonicación durante 20 seg en 200 μ l de tampón de fosforilación (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, Glicerol 10%, Leupeptina 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na orto-vanadato 1 mM). A continuación, se tomó una alícuota de 3 μ l de cada muestra para determinar la concentración de proteínas totales (ver apartado 8) y se almacenaron las muestras a -20 °C para su posterior análisis mediante *western blot* como se describe en el apartado 9.

8. Preparación de homogenados de cerebelo para *western blot*

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación con guillotina. Se aisló el cerebelo, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta la preparación de homogenados.

Se pesaron y homogenizaron los tejidos con en el “Ultraturrax”, añadiendo 5 volúmenes de tampón de homogenización (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, PMSF 0.2 mM, 1 pastilla de Cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche Diagnostics GMBH, Germany) en 50 ml).

Se sonicó y se se tomó una alícuota de 3 μ l de cada muestra para determinar la concentración de proteínas totales. Todo el proceso se realizó en frío y los homogenados se almacenaron a -20 °C para ser posteriormente analizados por *western blot* como se describe en el apartado 9.

La determinación de la concentración proteica total en las muestras se llevó a cabo mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit cat# 23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en una placa de 96 pocillos. Se analizaron puntos dobles para cada muestra y para la curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

9. Análisis del contenido de proteínas por *western blot*

Las muestras procedentes de protocolos de expresión en membrana van siempre por duplicado (con y sin BS3), por lo que para poder analizar un mayor número de muestras en cada blot se decidió cargarlas en unos geles de mayor tamaño que los empleados para las muestras de contenido proteico total. A pesar de ello, los protocolos son idénticos a excepción de las cantidades de reactivos empleadas y los tiempos de algunos pasos.

- Se separaron las proteínas de la muestra según sus masas moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles están formados por dos zonas con diferente concentración de acrilamida. La parte superior o *stacking* (25% Tris 0.5 M + 0.4% SDS con pH=6.8 ajustado con HCl, 13% mezcla Acrilamida/Bisacrilamida (cat# A0385, Panreac), 1% APS (cat# 7727-54-0, Merck-Millipore) y 0.2% TEMED (T9281, Sigma)), concentra la muestra en una banda estrecha antes del inicio de su separación, mientras que la parte inferior o *separating* (25% Tris 1.5M + 0.4% SDS con pH=6.8 ajustado con HCl, 20% mezcla Acrilamida/Bisacrilamida, 0.33% APS y 0.07% TEMED), permite la separación de las proteínas según su masa molecular. La concentración de acrilamida del *separating*, que determina el diámetro de poro final del gel, se ajustó en función de la masa molecular de las proteínas analizadas. En los pocillos del gel se cargó el volumen correspondiente de cada muestra con el fin de que la cantidad total de proteína cargada fuera la misma en todos los casos. Esta cantidad dependió de la abundancia relativa de las proteínas a analizar, la afinidad del anticuerpo utilizado y el área de procedencia de la muestra. Se cargaron 75 µg de proteína total en los geles pequeños (10x8 cm) (para analizar el contenido total de determinadas proteínas) y entre 100 y 200 µg en los geles grandes (20x18 cm) (para analizar expresión en membrana). Las muestras se diluyeron en tampón de carga 2X (65% Tris-HCl 0.5 M pH=6.8, 21% glicerol, 4% SDS, 10% 2-Mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C en un *termoblock*.
- La electroforesis se llevó a cabo introduciendo los geles en tampón *running* (Tris Base 25 mM, SDS 3.5 mM, Glicina 0.2 M) a una intensidad de la corriente de 25 mA por gel pequeño durante 1.5 h y de 10 mA por gel grande durante toda la noche (15-20 h).
- Se transfirieron las proteínas separadas en el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en tampón de transferencia (Tris Base 25 mM, Glicina 0.19 M, 20% metanol) y con una corriente de 250 mA durante 2 h para los geles pequeños y 240 mA durante 5 h para los geles grandes. A continuación, se bloquearon las membranas pequeñas con BSA al 5% en TBS-Tween (NaCl 150 mM, Tris Base 50 mM, 0.1%, Tween-20 pH 7.5) y las grandes con leche al 5% en TBS-Tween durante 45-60 min, con el fin de impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween durante 10 min.

- Se incubaron las membranas con el anticuerpo primario específico para la proteína a analizar. El anticuerpo primario se diluyó en BSA al 5% en TBS-Tween y la incubación se realizó durante toda la noche a 4°C.
- Se retiró el anticuerpo primario, se lavaron las membranas tres veces con TBS-Tween durante 10 min y se incubaron con un anticuerpo secundario (conjugado con la enzima de revelado: fosfatasa alcalina) durante 1 h a temperatura ambiente, y en agitación.
- Se revelaron las membranas para hacer visibles las proteínas. Para ello, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-Tween y a continuación se hizo un último lavado con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris Base 100 mM pH=9.5). Finalmente, se reveló utilizando un método colorimétrico para la enzima fosfatasa alcalina con una mezcla de 0.66% de NBT (*4-Nitro blue tetrazolium chloride*) y 0.34% de BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine*) en tampón sustrato. El tiempo de revelado variaba según la proteína, pero en cualquier caso la reacción fue detenida siempre antes de la saturación de las bandas, sumergiendo rápidamente las membranas en agua destilada.
- Una vez secas, las membranas se escanearon en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y la intensidad de las bandas se cuantificó con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK). Junto a cada proteína se analizó la actina como control de carga, por lo que la cuantificación de la intensidad de banda se relativizó siempre a la intensidad de la banda de actina. Los valores se expresaron siempre como porcentaje respecto al valor medio de las muestras procedentes de ratas control en cada *western blot*.

Las proteínas analizadas en muestras procedentes de protocolos de expresión en membrana se indican la tabla 3, y las de las que se ha medido el contenido total en cerebelo en la tabla 4.

Tabla 3. Proteínas medidas en muestras procedentes de los experimentos de expresión en membrana por *western blot*. Se indica casa comercial, referencia del catálogo y dilución empleada en cada caso

Anticuerpo I°	Casa comercial/Referencia	Concentración	Anticuerpo II°
GAT1	ABCAM AB426	1/500	Rabbit
GAT3	MILLIPORE AB1574	1/500	Rabbit
GLAST	NOVUS BIO NB100-1869	1/4000	Rabbit
GluA1	MILLIPORE 04-855	1/1000	Rabbit
GluA2	MILLIPORE AB1768-I	1/2000	Mouse
NR1	CELL SIGNALING 5704S	1/1000	Rabbit
NR2A	MILLIPORE 04-901	1/1000	Rabbit
NR2B	MILLIPORE 06-600	1/1000	Rabbit
GABA _A α1	ABCAM ab8341-50	1/1000	Rabbit
GABA _A α5	GENETEX GTX31004	1/1000	Rabbit

Tabla 4. Proteínas medidas en cerebelo por *western blot*. Se indica casa comercial, referencia del catálogo y dilución empleada en cada caso

Anticuerpo I°	Casa comercial/Referencia	Concentración	Anticuerpo II°
TNFα	BIOSOURCE ARC0062	1/500	Rabbit
GAT3	BIOSOURCE BS-1829R	1/200	Rabbit
Ocludina	ABCAM AB19160	1/1000	Rabbit
ZO1	ABCAM AB79056	1/1000	Rabbit
CCL2	PROTEINTECH 66272-1-Ig	1/1000	Mouse

10. Inmunohistoquímica

Para los estudios de inmunohistoquímica, las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital (1 ml/kg) y se perfundieron por vía intracardiaca con suero salino para eliminar la sangre. Para fijar los tejidos, se perfundieron 500 ml de PFA al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M (Na₂HPO₄ 75.4 mM; NaH₂PO₄ 24.6 mM) (pH 7.4) a temperatura ambiente. A continuación, el cerebro se extrajo cuidadosamente y se mantuvo en PFA durante un periodo no superior a 24 horas, tras el cual se guardó en una solución de PB 0.1 M con azida sódica al 0.01%. El tejido fijado se incluyó en

parafina y se cortaron secciones horizontales de 5µm utilizando un micrótopo (HM 340E, Leica).

Para desparafinar las muestras, se incubaron los cortes a 62°C durante 1 hora. A continuación, se llevó a cabo la recuperación antigénica. Para ello se sumergieron los cortes en una cubeta con el buffer adecuado (según el anticuerpo, Sodium Citrate Buffer con pH=6 o Tris-EDTA Buffer con pH=9) y se incubó a 95°C durante 20 minutos. Durante el proceso de inclusión en parafina se forman enlaces covalentes con las proteínas (antígenos) que dificultarían la unión del anticuerpo primario. Mediante un tratamiento con calor, se consigue romper dichos enlaces para un reconocimiento efectivo de la proteína de interés por parte del anticuerpo primario. La inmunohistoquímica se realizó manualmente o con un equipo de tinción Autostainer Link 48 (Dako Diagnósticos).

Para realizar la tinción manualmente se lavaron los cortes con PB 0.1 M y se incubaron durante 15 min con H₂O₂ al 3% para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Se lavaron los cortes con PTA (tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M con BSA al 0.1% y 0.1 % Triton-X100) para permeabilizarlos, y se incubaron en solución de bloqueo (suero de la especie en la que están hechos los anticuerpos secundarios al 5% en PTA). Se incubaron los cortes toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (Tabla 5) diluido en solución de bloqueo. Para eliminar el anticuerpo primario residual que no quedó adherido al tejido se lavaron los cortes con PTA. A continuación, se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario biotinalado diluido en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, y se lavaron con PBS 0.1 M para retirar anticuerpo secundario residual. Se incubaron los cortes durante 30 minutos con un complejo avidina-biotina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Vector), y se lavaron con PB 0.1 M. Para el revelado se incubaron los cortes entre 2 y 10 minutos con un sustrato colorimétrico, la diaminobenzidina (DAB), que reacciona con HRP.

Para la tinción con el Autostainer Link 48 se lavaron los cortes con PB 0.1 M y se incubaron durante 5 min con Endogenous Enzyme Block (FLEX peroxidase Block) para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. A continuación, se lavaron los cortes con el mismo tampón y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 5) diluido en solución de bloqueo. Se volvieron a lavar los cortes con el mismo tampón. Los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario (listos para usar, DAKO) conjugado con HRP durante 20 minutos. El anticuerpo secundario residual se retiró de los cortes mediante

varios lavados. Para el revelado se incubaron las rodajas durante 10 minutos con el DAB.

Tabla 5. Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica. Se indica casa comercial, referencia del catálogo y dilución empleada en cada caso

Anticuerpo I°	Casa comercial/Referencia	Concentración	Anticuerpo II°
IBA-1	WAKO 019-19741	1/300	Rabbit
GFAP	SIGMA G-3893	1/400	Mouse
TNF α	ABCAM ab66579	1/500	Rabbit
IL-1 β	ABCAM ab9722	1/200	Rabbit
CD4	NOVUS NBP1-19371	1/200	Rabbit
CCL20	ABCAM ab9829	1/500	Rabbit
CCL2	PROTEINTECH 66272-1-Ig	1/200	Mouse
CX3CL1	INVITROGEN 14-7986	1/200	Rabbit

A continuación, en ambos casos, los cortes se trataron con hematoxilina para conseguir una contra-tinción de los núcleos celulares. Finalmente, las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol: 70%, 96% y 100% durante 5, 5 y 10 minutos respectivamente. Tras la deshidratación, las rodajas se mantuvieron en xileno al menos durante 10 minutos y se montaron. Una vez secas, las preparaciones se escanearon en un escáner Pannoramic 250 (Automatic Brightfield Scan) o Aperio Versa. Las imágenes escaneadas fueron analizadas con los programas Pannoramic Viewer o ImageScope, que permiten realizar fotos a distintos aumentos de las regiones de interés.

10.1 Análisis de imágenes de inmunohistoquímica

Las imágenes obtenidas tras escanear las muestras procesadas como se ha descrito anteriormente se analizaron mediante los programas de análisis de imagen Image J (1.48v) o Imaje-Pro Plus. El análisis, que se detalla a continuación, fue diferente según la proteína y el área cerebral analizadas.

10.1.1 Análisis de la activación de microglía (IBA-1)

Para analizar la activación de la microglía se cuantificó el perímetro de las células marcadas con anticuerpo contra IBA-1 (del inglés “*ionized calcium-binding adapter molecule 1*”), una proteína que en el cerebro se expresa específicamente en la microglía.

El perímetro es menor en el caso de la microglía activada, que adopta una forma más ameboide, disminuyendo el número de ramificaciones. Se hicieron un total de 15 fotos (56X) por animal y por región analizada. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Image-Pro Plus. Se identificaron las células de interés seleccionando el color, y se aplicó un filtro de tamaño para eliminar las marcas correspondientes a ruido de fondo o a ramas de microglía de otro plano. Se seleccionó el perímetro como unidad de medida. Los valores de área se convirtieron de pixel en cm utilizando la barra de escala de la foto. Para el análisis estadístico, se promediaron las medias de los datos obtenidos para cada una de las fotos.

En cerebelo se analizó la sustancia blanca, mientras que en hipocampo se analizó el área total.

10.1.2 Análisis de la activación de astrocitos (GFAP)

Para el análisis de la activación de astrocitos se cuantificó la expresión de GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Se hicieron un total de 15 fotos (56X) por animal y por región analizada. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen Image J. Se convirtieron las imágenes a 8 bits y se aplicó la función *Autolocal threshold*; se eligió como método de análisis el método Bernsen. A continuación, se filtró por tamaño (*0-infinity*). Los resultados indican el área total teñida por GFAP, y se expresaron como porcentaje del control.

En cerebelo se analizó la sustancia blanca, mientras que en hipocampo se analizó el área total.

10.1.3 Análisis del contenido de TNF- α e IL-1 β

Para el análisis de la expresión de TNF- α e IL-1 β se utilizó el mismo procedimiento. Se hicieron un total de 6-10 fotos (20X) por animal y por región analizada. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J.

Para obtener el valor de intensidad de cada marcador en cada región analizada, se utilizó la herramienta “*ImageJ's ROI tools*”. Esto consiste en rodear todas las células de interés que aparecen en las imágenes y en utilizar zonas donde no se observa tinción como valores de fondo.

En hipocampo se midió la intensidad de la tinción de la proteína de interés en CA1, y a esta se restó el promedio del fondo. Los resultados se expresaron como “*mean grey value*”.

El contenido en las neuronas de Purkinje se calculó como valores de intensidad de la tinción de la proteína de interés en las células de Purkinje, al los que se les restó el promedio de las intensidades de fondo. Los resultados se expresaron como “*mean grey value*”.

En sustancia blanca el número de células positivas se contó manualmente utilizando la función “*cell counter*” y el area de la foto se midió con la herramienta “*freehand selection*”. Los valores de area se convirtieron de pixel en cm utilizando la barra de escala de la foto. Los resultados se expresaron como el como número de células/mm².

10.1.4 Análisis de la infiltración de linfocitos CD4⁺

El análisis de la infiltración de linfocitos CD4⁺ se realizó en meninges tanto de cerebelo como de hipocampo, y en los plexos coroideos de los ventriculos laterales (adyacentes a los hipocampos). Se realizó una foto que incluyese toda el área considerada y se analizó con el programa Image J. El número de linfocitos CD4⁺ se contó manualmente utilizando la función “*cell counter*” y el area de la foto o el perimetro de las meninges o plexos coroideos se midieron con la herramienta “*freehand selection*”. Los valores de longitud se convirtieron de pixel en cm utilizando la barra de escala de la foto. En cerebelo se contó el número de células positivas en el área total y los resultados se expresaron como número de células/cm². En hipocampo se contó el número de células positivas en el perimetro total y los resultados se expresaron como número de células/cm.

10.1.5 Análisis de la infiltración de macrófagos

Para el análisis de la infiltración de macrófagos (positivos para IBA-1) se hicieron un total de 10 fotos (20X) por animal y por región analizada. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J.

El análisis se realizó en meninges tanto de cerebelo como de hipocampo, y en los plexos coroideos de los ventriculos laterales. El número de macrófagos se contó manualmente utilizando la función “*cell counter*” y el perimetro de las meninges o plexos coroideos se analizó con la herramienta “*freehand selection*”. Los valores de longitud se convirtieron de pixel en mm utilizando la barra de escala de la foto y los resultados se expresaron como número de células/mm.

10.1.6 Análisis del contenido de CCL20 y CX3CL1

Para el análisis de la expresión de CCL20 y CX3CL1 se hicieron un total de 6-10 fotos (20X) por animal y por región analizada. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J. La expresión de CCL20 se analizó en meninges tanto de cerebelo como de hipocampo, en los plexos coroideos de los ventriculos laterales y en sustancia blanca de cerebelo. La expresión de CX3CL1 se analizó en meninges y en sustancia blanca de cerebelo.

En las meninges y en los plexos coroideos el número de células positivas se contó manualmente utilizando la función “*cell counter*” y la longitud de las meninges y de los plexos coroideos se analizó con la herramienta “*freehand selection*”. Los valores de longitud se convirtieron de pixel en cm utilizando la barra de escala de la foto. Los resultados se expresaron como el como número de células/mm.

En sustancia blanca de cerebelo el número de células positivas se contó manualmente utilizando la función “*cell counter*” y el area de la foto se midió con la herramienta “*freehand selection*”. Los valores de area se convirtieron de pixel en cm utilizando la barra de escala de la foto. Los resultados se expresaron como el como número de células/mm².

10.1.7 Análisis del contenido de CCL2

Para el análisis de la expresión de CCL2 se hicieron un total de 6-10 fotos (20X) por animal y por región analizada. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J.

Para obtener el valor de intensidad se utilizó la herramienta “*ImageJ's ROI tools*”.

En hipocampo se midió la intensidad de la tinción en CA1, y a esta se restó el promedio de las intensidades del fondo. Los resultados se expresaron como “*mean grey value*”.

El contenido en las neuronas de Purkinje se calculó como valores de intensidad de la tinción de la proteína de interés en las células de Purkinje, al los que se les restó el promedio de las intensidades del fondo. Los resultados se expresaron como “*mean grey value*”.

En sustancia blanca el número de células positivas se contó manualmente utilizando la función “*cell counter*” y el area de la foto se midió con la herramienta “*freehand selection*”. Los valores de area se convirtieron de pixel en cm utilizando la barra de escala de la foto. Los resultados se expresaron como el como número de células/mm².

11. Análisis de la densidad neuronal

El tejido se obtuvo como descrito en el apartado 10. Para la cuantificación de la densidad neuronal en la capa granular y capa de Purkinje de cerebelo se realizó una tinción hematoxilina-eosina con el Autostainer XL (LEICA). Se hicieron un total de 10 fotos (56X) por animal y por región analizada. A continuación, las imágenes fueron analizadas con el programa Image J.

La densidad de células granulares se cuantificó automáticamente utilizando las funciones “*auto local threshold*” y “*analyze particles*”. Para seleccionar células granulares, se usó el método “*intermode*” y no se aplicó ningún filtro de tamaño. Los resultados se expresaron como porcentaje del control.

Las células de Purkinje se contaron manualmente utilizando la función “*cell counter*” y los resultados se expresaron como porcentaje del control.

12. Determinación de los niveles de factores inflamatorios en plasma

Para estudiar la progresión de la inflamación con la progresión de daño hepático se analizaron factores inflamatorios en plasma a 1, 2, 4, 8 y 12 semanas tras la primera inyección de CCl₄.

La muestra de sangre (500 µl) se obtuvo por punción de la vena safena. Para la obtención de plasma se añadieron 50 µl de EDTA 10 mM, se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante.

12.1 Determinación de TNF α

Los niveles de TNF α se midieron mediante un kit ELISA como indicado por el comerciante (ThermoFisher 88-7340-22), utilizando 100 µl de plasma.

12.2 Determinación de citocinas por *western blot*

Se tomó una alícuota de 2 µl de cada muestra y se diluyó 1:20 para determinar la concentración de proteínas totales (ver apartado 8). Se almacenaron las muestras a -20 °C para su posterior análisis mediante *western blot* como se describe en el apartado 9. Las proteínas analizadas fueron las de la tabla 6.

Tabla 6. Citocinas analizada en plasma por *western blot*. Se indica casa comercial, referencia del catálogo y dilución empleada en cada caso

Anticuerpo I°	Casa comercial/Referencia	Concentración	Anticuerpo II°
IL-6	BIOSOURCE ARC0062	1/500	Rabbit
IL-15	BIOSOURCE BS-1829R	1/200	Rabbit
IL-18	ABCAM AB19160	1/1000	Rabbit
IL-17	ABCAM AB79056	1/1000	Rabbit
IFN- γ	RDSsystems MAB5851	1/1000	Mouse
IL-4	ABCAM AB9811	1/1000	Rabbit
IL-10	ABCAM AB9969	1/1000	Rabbit
TGF- β	INVITROGEN PA5-99186	1/1000	Rabbit
CCL20	ABCAM AB9829	1/1000	Rabbit
CCL2	PROTEINTECH 66272-1-Ig	1/1000	Mouse
CX3CL1	INVITROGEN 14-7986	1/1000	Rabbit
CCL5	INVITROGEN 710001	1/500	Rabbit

13. Estudio de poblaciones leucocitarias en sangre total mediante citometría de flujo

Las poblaciones leucocitarias se analizaron en las ratas a las 2, 4, 8 y 12 semanas del inicio de la administración de CCl₄.

Para el estudio de las poblaciones leucocitarias se utilizó la técnica de inmunodetección mediante citometría de flujo. Se trata de una técnica utilizada para detectar y analizar las características físicas y químicas de una población de células o partículas. Mediante un haz de luz láser se puede llevar a cabo la detección, el recuento, la caracterización y, utilizando instrumentos avanzados, la separación de células en suspensión. El citómetro de flujo puede medir simultáneamente algunos parámetros morfológicos derivados del cruce de células individuales por un haz de luz láser. El instrumento se llama de flujo porque las células fluyen rápida e individualmente a través del haz de luz que las golpea; de esta forma la luz dispersada es característica de las células y de sus componentes. Las células a menudo se etiquetan con marcadores fluorescentes para que la luz se absorba primero y luego se emita en una banda de longitudes de onda. Se

pueden examinar rápidamente decenas de miles de células y los datos recopilados son procesados por un ordenador.

Para estudiar las poblaciones presentes en sangre utilizamos 4 paneles compuestos por diferentes combinaciones de anticuerpos marcados con un fluoróforo.

Las combinaciones de anticuerpos utilizados fueron las de las Tablas de 7 a 10.

Tabla 7. Panel de anticuerpos utilizados para analizar los linfocitos *naïve* y de memoria

Anticuerpo	Fluoróforo	Casa comercial/Referencia	Concentración
CD45	PEVio770	Miltenyi 130-107-791	1:20
CD3	FITC	Miltenyi 130-102-678	1:100
CD4	VioBlue	Miltenyi 130-107-622	1:100
CD8	PercPVio700	Miltenyi 130-108-885	1:10
CD44	APCVio770	Miltenyi 130-107-805	1:10
CD62L	BV786	BDBiosc 743152	1:50

Tabla 8. Panel de anticuerpos utilizados para analizar los linfocitos Treg

Anticuerpo	Fluoróforo	Casa comercial/Referencia	Concentración
CD45	PEVio770	Miltenyi 130-107-791	1:20
CD3	FITC	Miltenyi 130-102-678	1:100
CD4	VioBlue	Miltenyi 130-107-622	1:100
CD8	PercPVio700	Miltenyi 130-108-885	1:10
CD25	BV786	BDBiosc 742757	1:50
FoxP3	PE	Biolegend 320008	1:10

Tabla 9. Panel de anticuerpos utilizados para analizar los linfocitos B y los linfocitos T autoreactivos

Anticuerpo	Fluoróforo	Casa comercial/Referencia	Concentración
CD45	PEVio770	Miltenyi 130-107-791	1:20
CD3	FITC	Miltenyi 130-102-678	1:100
CD4	VioBlue	Miltenyi 130-107-622	1:100
CD8	PercPVio700	Miltenyi 130-108-885	1:10
CD45R	APC	Miltenyi 130-106-775	1:10
CD28	BV786	BDBiosc 742587	1:10

Tabla 10. Panel de anticuerpos utilizados para analizar los monocitos

Anticuerpo	Fluoroforo	Casa comercial/Referencia	Concentración
CD45	PEVio770	Miltenyi 130-107-791	1:20
CD11b	V450	BDBiosc 562108	1:50
CD80	PE	BDBiosc 555014	1:10

La muestra de sangre de partida (500 μ l) se obtuvo por punción de la vena safena y fue extraída en un tubo con EDTA para impedir la coagulación de la muestra.

La sangre se pasó a un tubo falcon de 50 ml evitando coger los posibles coágulos. A partir de este paso el protocolo se llevó a cabo en hielo. Se lisaron los eritrocitos añadiendo 2 ml por cada 100 μ l de sangre de una dilución 1:10 en agua destilada de la solución de lisis 10X RBC Lysis Buffer Multi-species (Thermo-Invitrogen eBioscience), e incubando durante 10 minutos en hielo y oscuridad. La detección eficiente de linfocitos en sangre periférica depende de la eliminación de células que interfieren. Se ha demostrado que la lisis de sangre total es tan efectiva como la centrifugación en gradiente de densidad en la preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para el análisis de subconjuntos de linfocitos. Terminada la lisis, se recogió el pellet centrifugando a 200 g durante 5 minutos a 4°C. Se realizaron 2 lavados con PBS, tras lo cuales se recogió nuevamente el pellet centrifugando a 200 g durante 5 minutos a 4°C. Se resuspendieron las células en 100 μ l de PBS, y se añadió CD32 (BD Bioscience) como bloqueo de los receptores Fc para inhibir la unión no específica, a una dilución 1:100, y se incubó durante 10 minutos en hielo y oscuridad. Los receptores Fc se encuentran en monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B. Como su nombre indica, se unen a los anticuerpos a través de su dominio Fc constante en lugar del dominio Fab específico del antígeno. Este tipo de enlace puede conducir a falsos positivos y datos sin sentido. Tras el bloqueo, se llevó la muestra a un volumen final de 200 μ l, y se repartió en cantidades iguales en 4 tubos, cada uno correspondiente a uno de los paneles de las tablas 7-10. Se realizó la tinción con las combinaciones de anticuerpos que se indican en las tablas 7-10. Para el panel 3 se incubó con todos los anticuerpos menos FoxP3, ya que siendo un factor de

transcripción, y por lo tanto intranuclear, necesita de un protocolo diferente para poder ser detectado. La incubación duró 30 minutos en hielo y oscuridad. Se recogió el pellet y se lavó con PBS, tras lo cual se resuspendió el pellet en 100 µl de PBS. Se añadió el marcador de viabilidad Zombie Yellow (Biolegend) (1:100) y se incubó durante 15 minutos. Siguió 2 lavados con PBS y finalmente se resuspendieron los tubos 1, 2 y 4 en 300 µl de PBS y el tubo 3 en 100 µl de PBS, para poder seguir con el protocolo de tinción nuclear. Para mejorar la viabilidad el PBS empleado a lo largo de todo el protocolo fue suplementado con EDTA 2 mM y 1 % de BSA.

Para la tinción de FoxP3 se utilizó el kit eBioscience “Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (ThermoFisher)”. Se preparó la Foxp3 *Fixation/Permeabilization working solution* diluyendo 1 parte de Foxp3 *Fixation/Permeabilization Concentrate* en 3 partes del Foxp3 *Fixation/Permeabilization Diluent*. Se preparó la *working solution* del buffer de permeabilización diluyendo 1 parte del buffer de permeabilización 10X en 9 partes de agua destilada. Se añadió 1 ml de Foxp3 *Fixation/Permeabilization working solution* a la muestra, se mezcló con vortex y se incubó durante 30-60 minutos en hielo y oscuridad. Se añadieron 2 ml del buffer de permeabilización 1X y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se resuspendió el pellet en 100 µl del buffer de permeabilización 1X y se añadió el anticuerpo para la detección de FoxP3. Se incubó 30 minutos en hielo y oscuridad. Se añadieron 2 ml del buffer de permeabilización 1X y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se realizó un lavado en buffer de permeabilización 1X. Finalmente se resuspendieron las células en 300 µl de PBS.

Se adquirieron las muestras en el citómetro CytoFLEX (BeckmanCoulter). Para el análisis posterior se utilizó el software CytExpert (BeckmanCoulter). La citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas y presencia de biomarcadores. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células.

Es importante tener en cuenta la autofluorescencia de la propia muestra, para lo cual, lisamos 50 µl de sangre e incubamos 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

Se pasó por el citometro esta muestra como control negativo de la posible autofluorescencia de la muestra para considerar solamente la fluorescencia emitida por la excitación del fluoróforo unido a nuestra proteína de interés. También se prepararon tubos con fluoróforos individuales para llevar a cabo la compensación, una corrección matemática de una superposición de señal entre los canales de los espectros de emisión de diferentes fluorocromos.

13.1 Análisis de linfocitos T *naïve* y de memoria

Mediante la combinación de anticuerpos de la tabla 7 se identificaron los leucocitos por morfología y por ser positivos para CD45, y se subdividió esta población en:

- Linfocitos T: marcados con CD3 dentro de la población de leucocitos (CD45⁺)
- Linfocitos T CD4: son células CD4⁺ dentro de la población de linfocitos T (CD3⁺)
- Linfocitos T CD8: son células CD8⁺ dentro de la población de linfocitos T (CD3⁺)
- Linfocitos T de memoria: son células CD44^{high}CD62L^{low} dentro de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺
- Linfocitos T *naïve*: son células CD44^{low}CD62L^{high} dentro de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺.

(Figura 24)

13.2 Análisis de linfocitos T reguladores

Mediante la combinación de anticuerpos de la tabla 8 se identificaron los leucocitos por morfología y por ser positivos para CD45, y se subdividió esta población en:

- Linfocitos T: marcados con CD3 dentro de la población de leucocitos (CD45⁺)
- Linfocitos T CD4: son células CD4⁺ dentro de la población de linfocitos T (CD3⁺)
- Linfocitos T CD8: son células CD8⁺ dentro de la población de linfocitos T (CD3⁺)
- Linfocitos T CD4 reguladores: son células células CD25⁺ y FoxP3⁺ dentro de la población de linfocitos T CD4⁺
- Linfocitos T CD8 reguladores: son células células CD25⁺ y FoxP3⁺ dentro de la población de linfocitos T CD8⁺.

(Figura 25)

13.3 Análisis de linfocitos T autoreactivos

Mediante la combinación de anticuerpos de la tabla 9 se identificaron los leucocitos por morfología y por ser positivos para CD45, y se subdividió esta población en:

- Linfocitos T: marcados con CD3 dentro de la población de leucocitos
- Linfocitos T CD4: son células CD4⁺ dentro de la población de linfocitos T (CD3⁺)
- Linfocitos T CD8: son células CD8⁺ dentro de la población de linfocitos T (CD3⁺)
- Linfocitos T CD4 autoreactivos: son células CD4⁺CD28⁻ dentro de la población de linfocitos T CD4
- Linfocitos T CD8 autoreactivos: son células CD8⁺CD28⁻ dentro de la población de linfocitos T CD4.

(Figura 26)

13.4 Análisis de linfocitos B

Mediante la combinación de anticuerpos de la tabla 9 se identificaron los leucocitos por morfología y por ser positivos para CD45, y dentro de ellos la población de linfocitos B, marcados con CD45R (Figura 27).

13.5 Análisis de monocitos

Mediante la combinación de anticuerpos de la tabla 10 se identificaron los monocitos por su morfología, por ser positivos para CD45, y por estar marcados con CD11b, y dentro de ellos los monocitos activados, que son células CD80⁺ dentro de la población CD11b⁺ (Figura 28).

14. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el GraphPad Software, Inc. versión 7.0. Los datos se evaluaron para determinar su normalidad y si las varianzas de los diferentes grupos eran o no estadísticamente diferentes. En el caso de que los datos fueran normales y las varianzas iguales se realizó un análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA) seguido de un test post-hoc. En los casos indicados se realizó un análisis de dos vías de medidas repetidas. Cuando se compararon solamente dos grupos se utilizó el t-test de Student. En los casos indicados en los que los datos no eran normales se aplicó el test no paramétrico indicado. En los casos en los que las varianzas eran significativamente diferentes se aplicó la corrección de Wech. Se consideró como significativo un valor $p < 0.05$. Los resultados se expresaron como media \pm SEM (error estándar de las media) del número de animales indicado en cada caso.

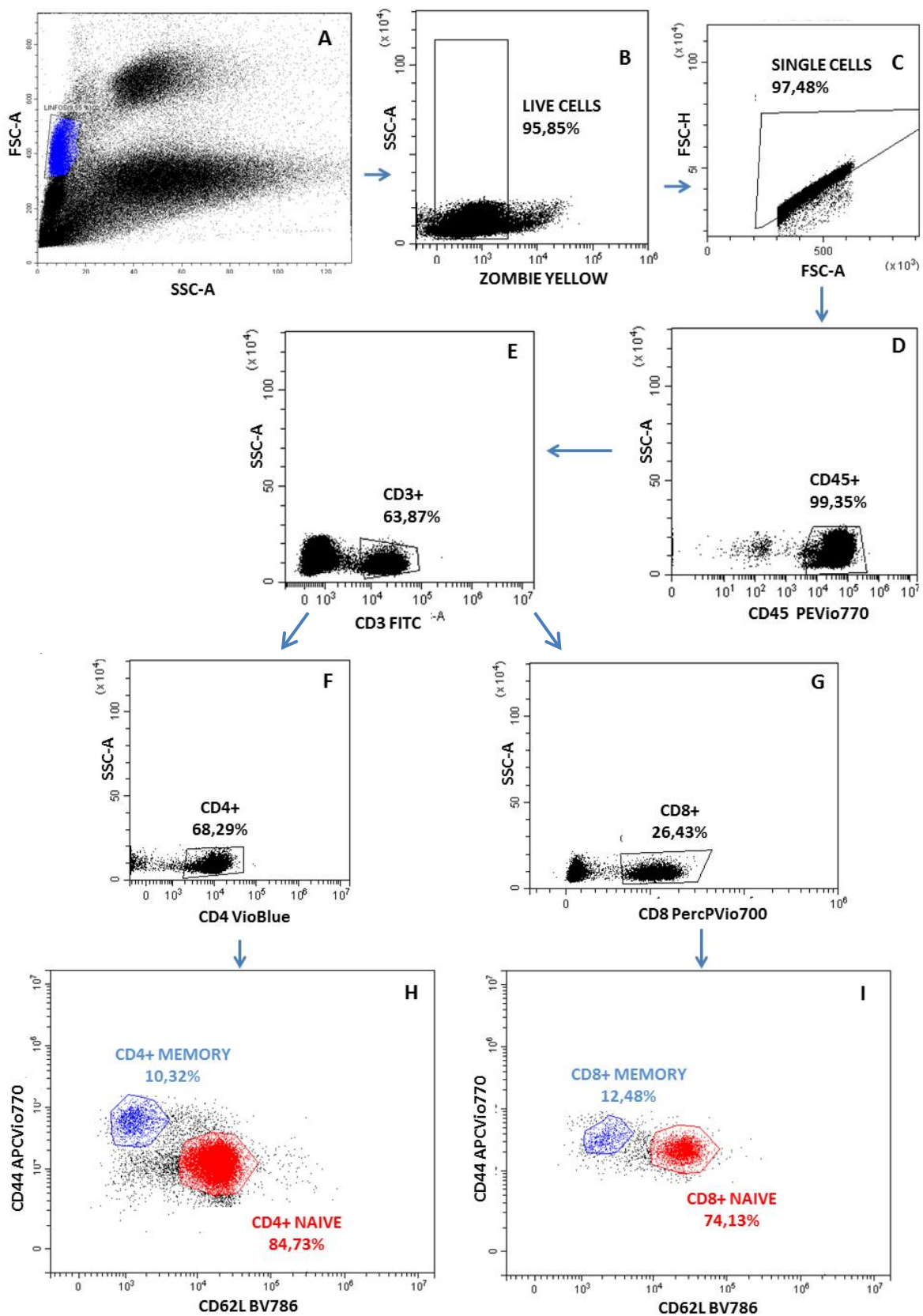


Figura 24. Ejemplo de estrategia de selección para los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ *naïve* y de memoria. (A) Se seleccionan los linfocitos por morfología. (B) Se identifican las células vivas. (C) Se eliminan las células agregadas. (D) Se identifican las células CD45⁺ y dentro de estas las (E) CD3⁺. A partir de los linfocitos CD3⁺ se identifican los (F) CD4⁺ y (G) CD8⁺. Se identifican las células *naïve* y las de memoria dentro de los linfocitos CD4⁺ (H) y CD8⁺ (I).

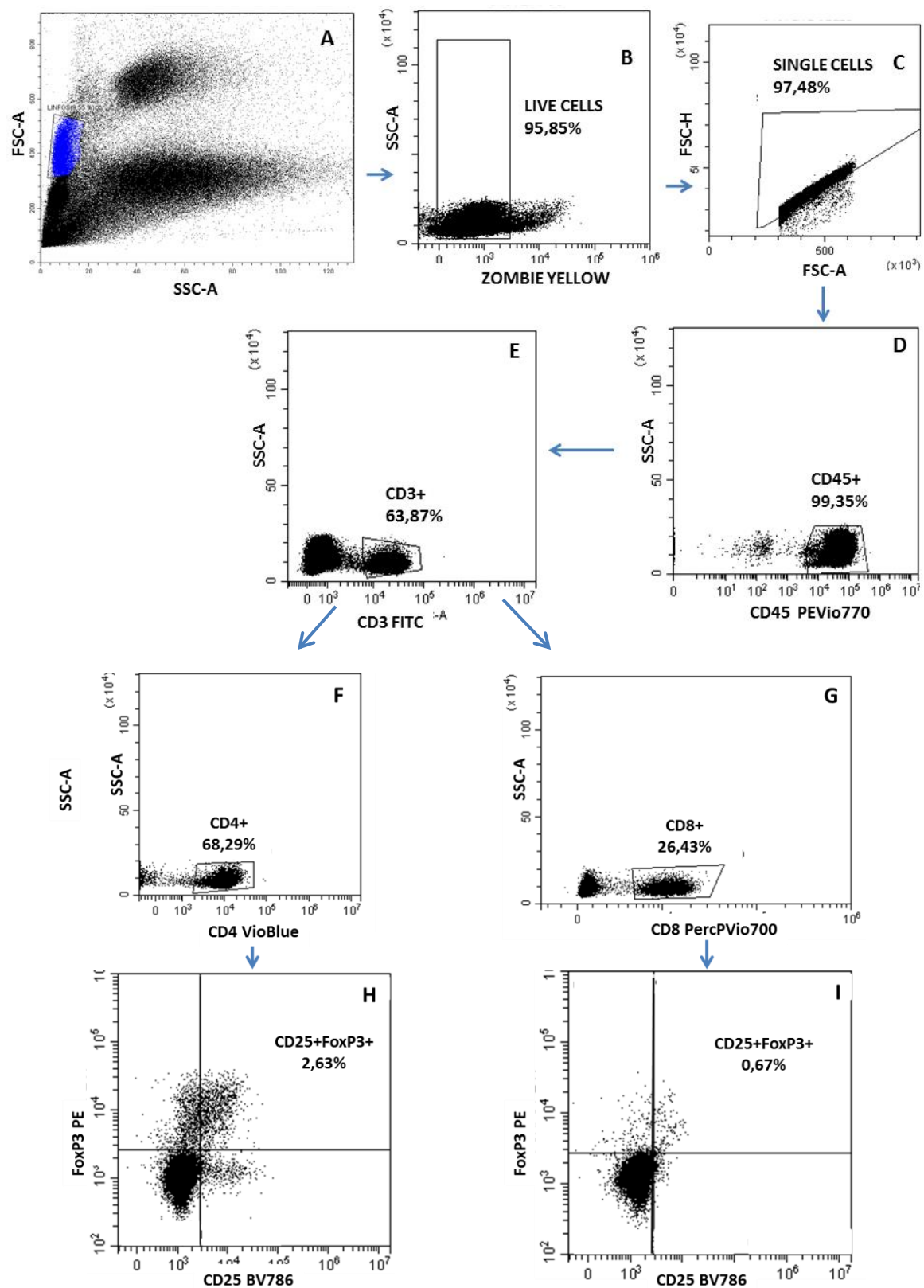


Figura25. Ejemplo de estrategia de selección para los linfocitos T reguladores CD4⁺ y CD8⁺. (A) Se seleccionan los linfocitos por morfología. (B) Se identifican las células vivas. (C) Se eliminan las células agregadas. (D) Se identifican las células CD45⁺ y dentro de estas las (E) CD3⁺. A partir de los linfocitos CD3⁺ se identifican los (F) CD4⁺ y (G) CD8⁺. Se identifican las células reguladoras positivas para CD25 y FoxP3 dentro de los linfocitos CD4⁺ (H) y CD8⁺ (I).

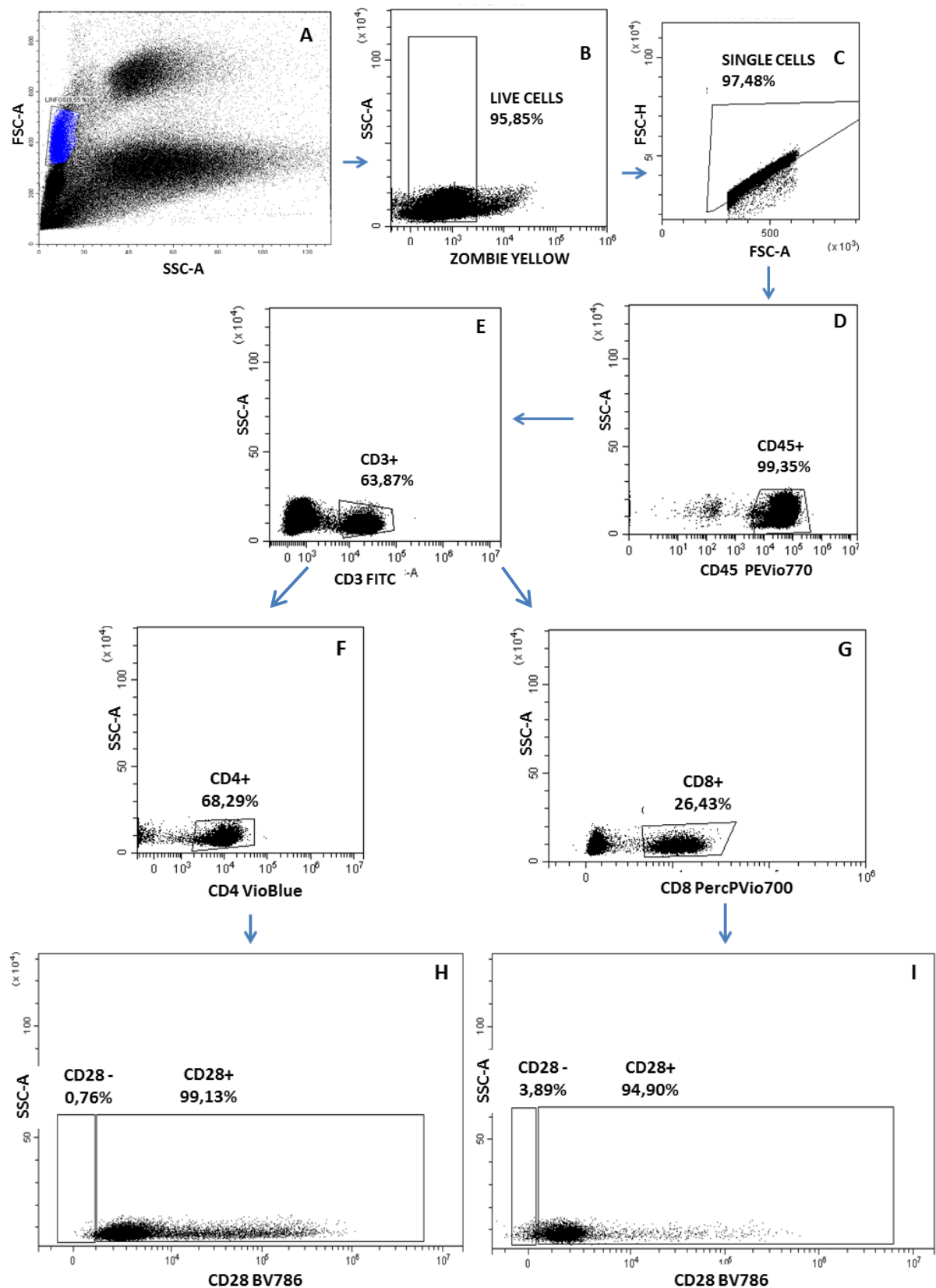


Figura 26. Ejemplo de estrategia de selección para los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ autoreactivos. (A) Se seleccionan los linfocitos por morfología. (B) Se identifican las células vivas. (C) Se eliminan las células agregadas. (D) Se identifican las células CD45⁺ y dentro de estas las (E) CD3⁺. A partir de los linfocitos CD3⁺ se identifican los (F) CD4⁺ y (G) CD8⁺. Se identifican las células autoreactivas dentro de los linfocitos CD4⁺ (H) y CD8⁺ (I).

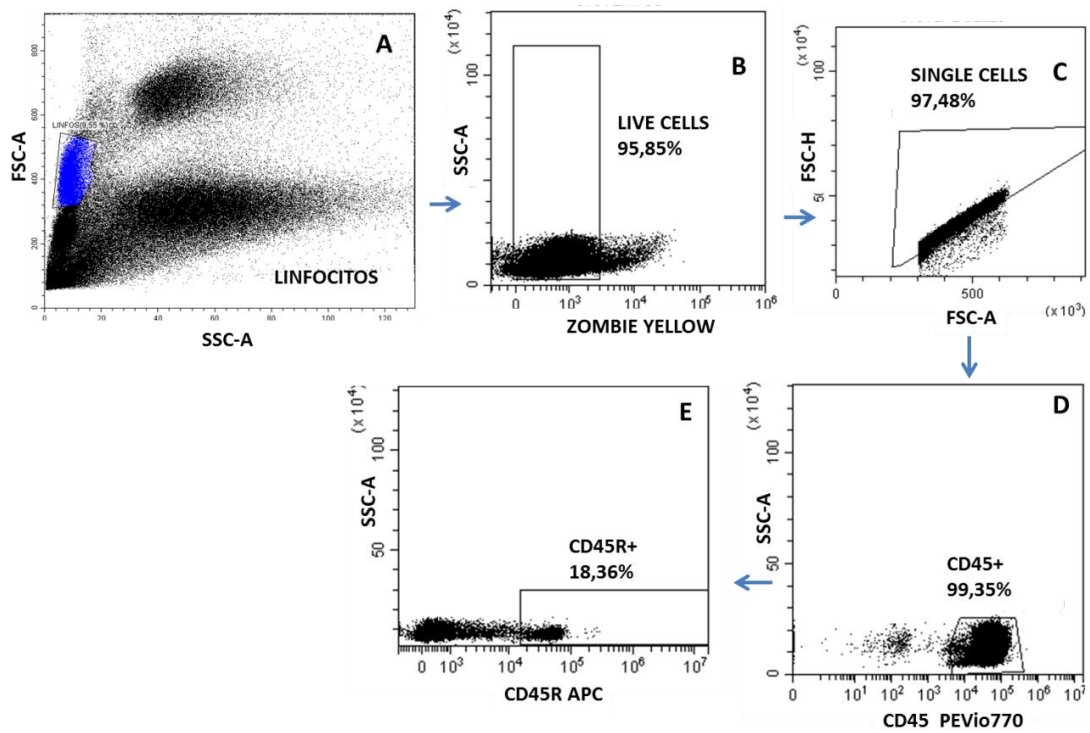


Figura27. Ejemplo de estrategia de selección para los linfocitos B. (A) Se seleccionan los linfocitos por morfología. (B) Se identifican las células vivas. (C) Se eliminan las células agregadas. (D) Se identifican las células CD45⁺ y dentro de estas (E) los linfocitos B.

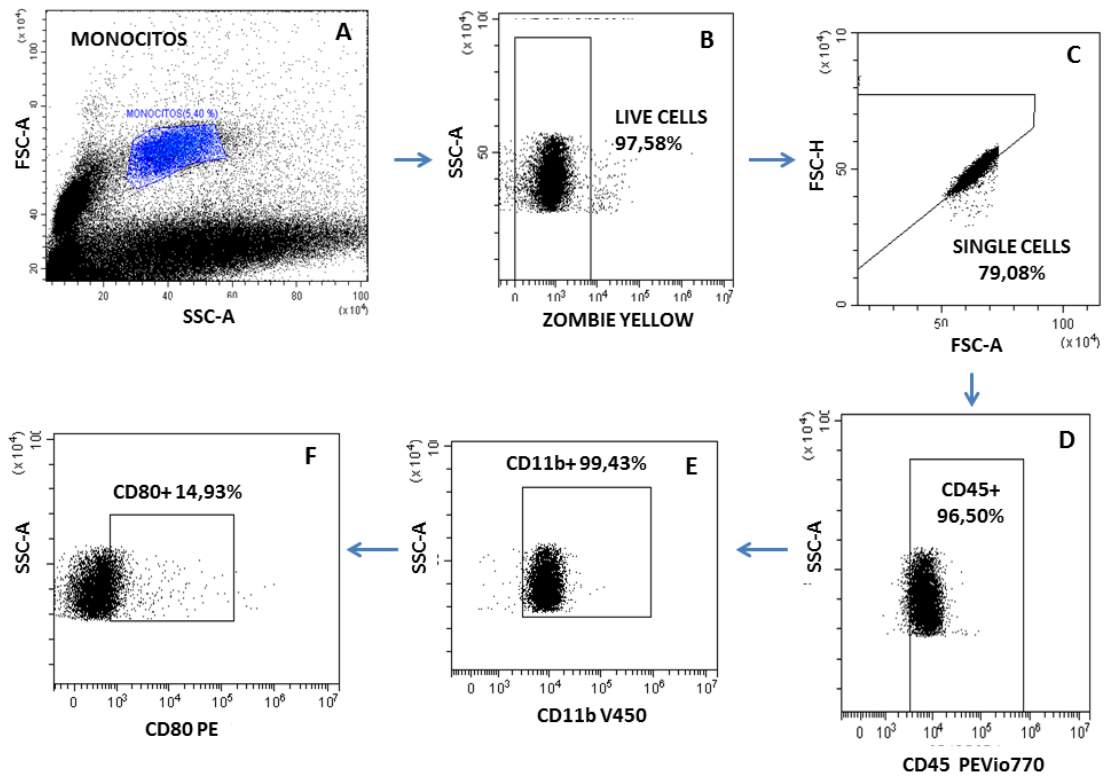


Figura28. Ejemplo de estrategia de selección para los monocitos. (A) Se seleccionan los monocitos por morfología. (B) Se identifican las células vivas. (C) Se eliminan las células agregadas. (D) Se identifican las células CD45⁺ y dentro de estas (E) los monocitos, dentro de los cuales se identifican (F) los monocitos activados.

RESULTADOS

1. La administración crónica de CCl₄ induce daño hepático progresivo

En primer lugar, examinamos si las ratas inyectadas con CCl₄ mostraban características patológicas de daño hepático y cómo éste evolucionaba con las semanas de administración crónica de CCl₄.

Después de dos semanas de administración de CCl₄, las ratas muestran un grado 1 de acumulación de grasa en el hígado (5-33% de los hepatocitos almacenan gotitas de grasa) (Figura 29 A y E), una inflamación lobular débil, especialmente en el grupo CCl₄ tratado con rifaximina (menos de 2 focos inflamatorios en un campo de 200x) (Figura 29 A y F) y, en algunos casos, una acumulación perisinusoidal o periportal anormal de fibras de colágeno (pero no significativa) (Figura 29 G y K). Todos estos cambios son compatibles con los observados en pacientes con esteatohepatitis leve. En las ratas inyectadas con CCl₄ durante cuatro semanas, se observa inflamación lobular y fibrosis significativas (Figura 29 B, F, H, K), signos claros de esteatohepatitis. Tras ocho semanas de administración de CCl₄, se observa un aumento del grado de inflamación lobular, pero que no alcanza el grado 2 (2-4 focos inflamatorios en un campo de 200x) y un grado 2 de fibrosis, con acumulación perisinusoidal o periportal de fibras de colágeno (Figura 29 C, F, I, K). Estos cambios son compatibles con los observados en pacientes con esteatohepatitis avanzada. En las ratas inyectadas con CCl₄ durante doce semanas, se observa un grado 2 de acumulación de grasa en el hígado (33-66% de los hepatocitos que almacenan gotitas de grasa) (Figura 29 D y E), inflamación lobular de grado 2 (Figura 29 D y F), y grado 4 de fibrosis, con formación de fibras de colágeno a puente, que indica presencia de cirrosis (Figura 29K). El tratamiento diario con rifaximina no produce ningún efecto sobre el daño hepático.

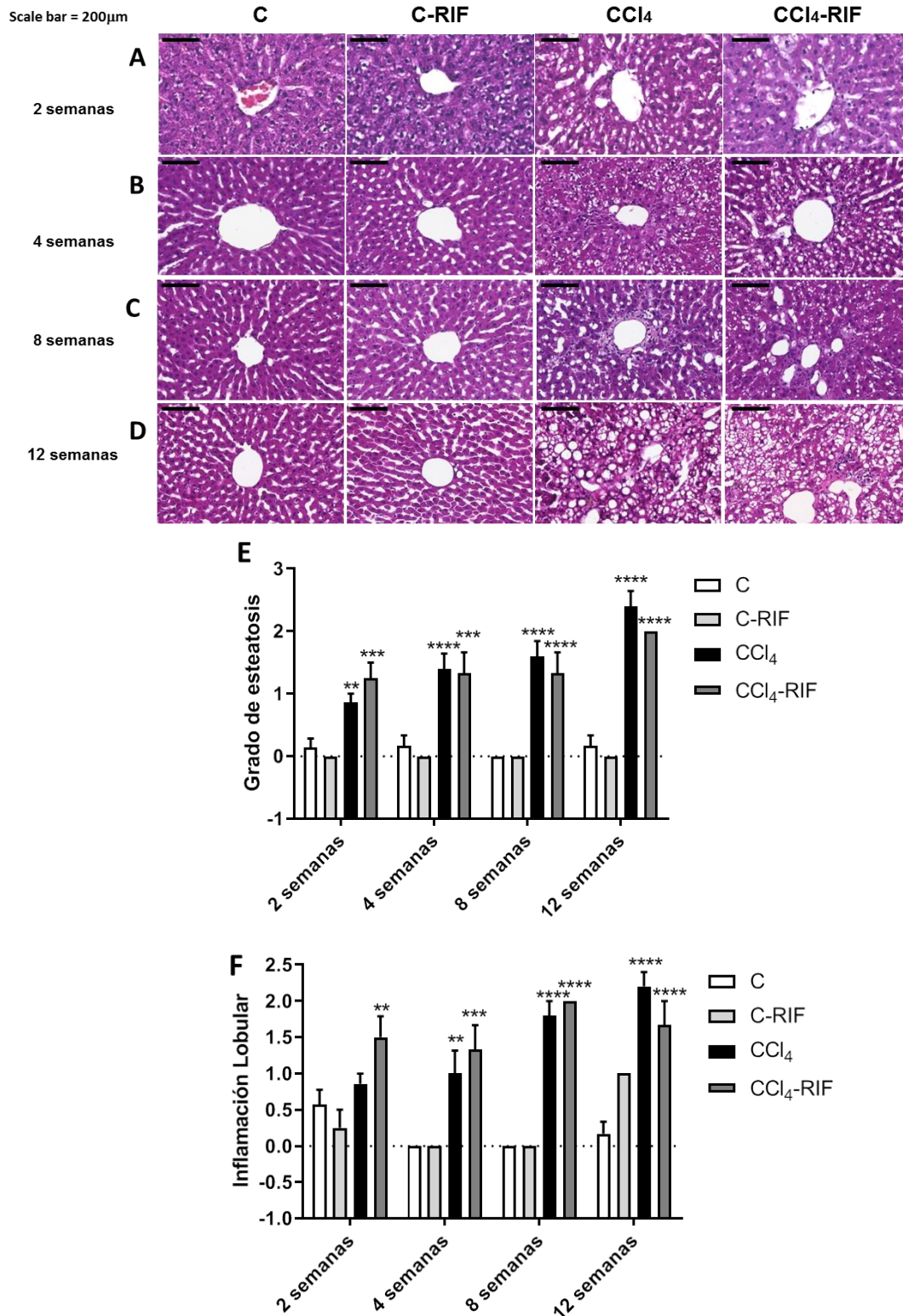


Figura 29 A-F. Las ratas inyectadas con CCl₄ muestran daño hepático progresivo. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2, 4, 8 y 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la esteatosis y la inflamación lobular mediante una tinción de hematoxilina-eosina. Los valores son la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3-7 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y test de comparaciones múltiples de Bonferroni. (E) $F(3, 57) = 6.428$ para el efecto del tiempo, $***p < 0.001$; $F(3, 57) = 79.99$ para el efecto del grupo, $****p < 0.0001$; $F(9, 57) = 3.237$ para el efecto de la interacción, $**p < 0.01$. (F) $F(3, 57) = 7.153$ para el efecto del tiempo, $***p < 0.001$; $F(3, 57) = 57.51$ para el efecto del grupo, $****p < 0.0001$; $F(9, 57) = 4.557$ para el efecto de la interacción, $***p < 0.001$. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, y $****p < 0.0001$.

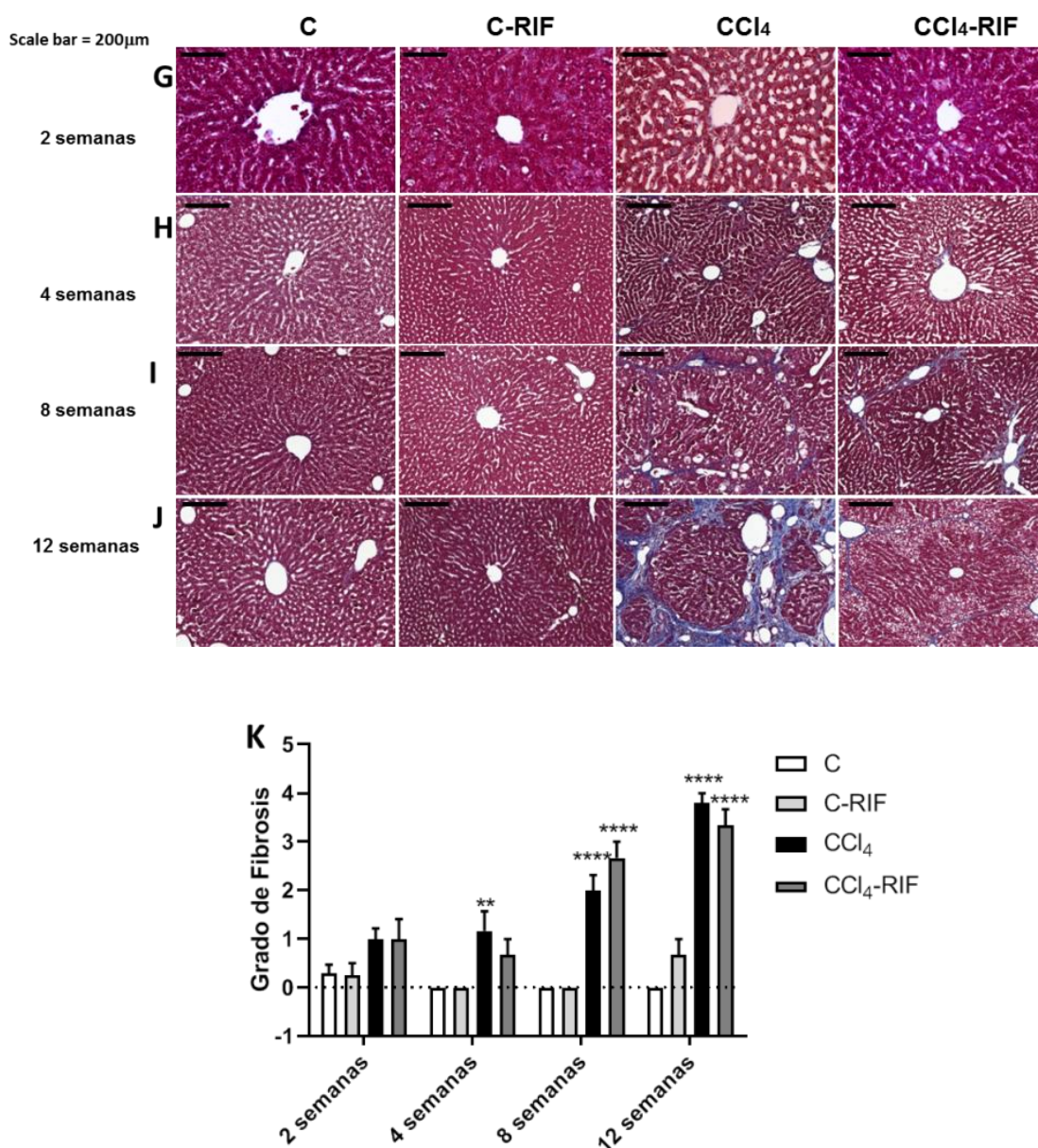


Figura 29 G-K. Las ratas inyectadas con CCl₄ muestran daño hepático progresivo. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2, 4, 8 y 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la fibrosis hepática mediante una tinción de Mason. Los valores son la media \pm SEM (error estándar de la media) de 3-7 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y test de comparaciones múltiples de Bonferroni. (K) $F(3, 58) = 25.59$ para el efecto del tiempo, $****p < 0.0001$; $F(3, 58) = 72.72$ para el efecto del grupo, $****p < 0.0001$; $(9, 58) = 9.108$ para el efecto de la interacción, $****p < 0.0001$. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, y $****p < 0.0001$.

2. Hiperamonemia en ratas con distinto grado de daño hepático

Comparando cada grupo con el control se observa un aumento significativo de los niveles de amonio en ratas control tratadas con rifaximina ($p < 0.05$), en ratas inyectadas con CCl₄ ($p < 0.0001$), y en ratas CCl₄ tratadas con rifaximina ($p < 0.001$).

Las ratas inyectadas con CCl_4 muestran niveles elevados de amonio en sangre a partir de la semana 6 (101.3 ± 19.14 frente a $43.6 \pm 8.3 \mu\text{M}$, $p < 0.01$), con esteatohepatitis evidente. Los niveles de amonio permanecen altos a las 8 semanas en ratas CCl_4 (86.1 ± 14.9 frente a $30.9 \pm 8.4 \mu\text{M}$ en controles, $p < 0.01$) y a 12 semanas (67.75 ± 8.9 frente a $39.5 \pm 6.7 \mu\text{M}$ en controles, ns). A 6 semanas se observa un aumento en los niveles de amonio en sangre en ratas control rifaximina (92.4 ± 13.7 frente a 43.6 ± 8.3 en controles, $p < 0.05$) y en ratas CCl_4 tratadas con rifaximina (88.8 ± 8.6 , $p < 0.05$). También se observa un aumento a 8 (79.1 ± 13.3 frente a $30.9 \pm 8.4 \mu\text{M}$, $p < 0.01$) y 12 (80.7 ± 15.6 frente a $39.5 \pm 6.7 \mu\text{M}$, $p < 0.01$) semanas de los niveles de amonio en sangre en ratas CCl_4 tratadas con rifaximina. Estos resultados confirman que el daño hepático por administración crónica de CCl_4 induce hiperamonemia y que el tratamiento con rifaximina no previene el aumento de amonio en sangre en estas ratas. Además, en las ratas control la rifaximina produce un aumento transitorio de amonio en sangre.

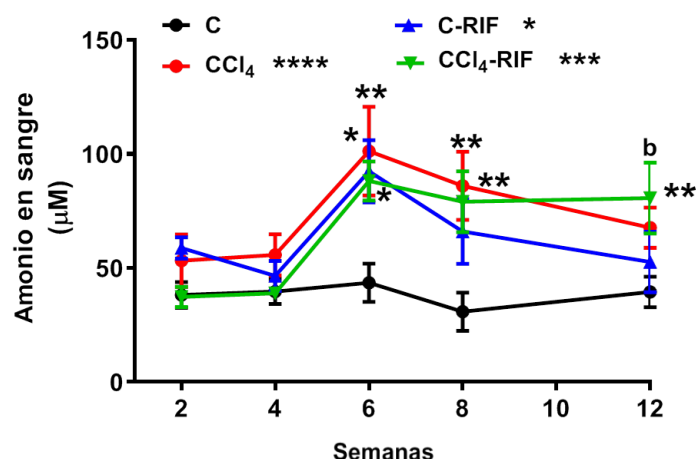


Figura 30. Las ratas inyectadas con CCl_4 presentan hiperamonemia a partir de la sexta semana. La rifaximina no la previene. Se analizaron los niveles de amonio en ratas inyectadas con CCl_4 durante 2, 4, 6, 8 y 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo. Los valores son la media \pm SEM de 3-17 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y test de comparaciones múltiples de Bonferroni. $F(4, 155) = 5.573$ para el efecto del tiempo, $***p < 0.001$; $F(3, 155) = 8.322$ para el efecto del grupo, $****p < 0.0001$. Se comparó cada grupo con el control: C-RIF $*p < 0.5$, $\text{CCl}_4****p < 0.0001$, $\text{CCl}_4\text{-RIF}***p < 0.001$. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, y “b” indica diferencia significativa respecto al grupo control tratado con rifaximina $b^*p < 0.05$.

3. Las ratas con esteatohepatitis muestran incoordinación motora que mejora mediante el tratamiento con rifaximina

Las ratas con esteatohepatitis leve muestran empeoramiento de la coordinación motora en el *rotarod*, permaneciendo en ello una media de 143 ± 9 s, mientras que las ratas control permanecen de media 182 ± 9 s ($p < 0.05$). La rifaximina mejora la

incoordinación motora en ratas con esteatohepatitis leve, las cuales permanecen 180 ± 8 s en el rotarod (Figura 31A). Resultados similares se observan en el *beam walking* a las 5 semanas de administración de CCl_4 . Las ratas con esteatohepatitis presentan 1.90 ± 0.29 resbalones, mientras que las ratas control, 0.78 ± 0.13 resbalones ($p < 0.05$). El tratamiento con rifaximina previene ($p < 0.05$) la alteración de la coordinación motora en ratas con esteatohepatitis (0.81 ± 0.12 resbalones) (Figura 31B).

En ratas con esteatohepatitis avanzada, tras 10 semanas de administración de CCl_4 no se observan diferencias entre los grupos en el *rotarod* (Figura 31C), pero sí en el *beam walking*. Las ratas con esteatohepatitis avanzada tienen 2.94 ± 0.62 resbalones, comparado con las ratas control que tienen 1.36 ± 0.20 resbalones ($p < 0.05$). El tratamiento con rifaximina previene (1.19 ± 0.23 resbalones, $p < 0.05$) la alteración de la coordinación motora en ratas con esteatohepatitis avanzada (Figura 31D).

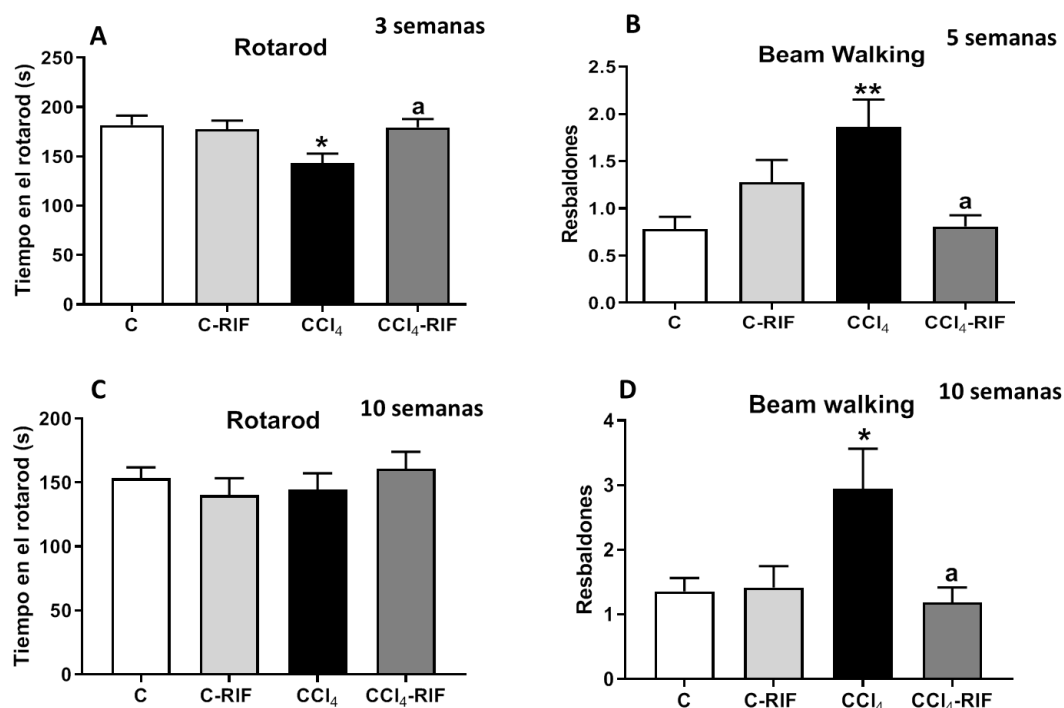


Figura 31. La rifaximina previene la incoordinación motora en ratas con esteatohepatitis. Se analizó en ratas inyectadas con CCl_4 durante 3-5 (A-B) y 10 (C-D) semanas, y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el tiempo de permanencia en el rotarod (A-C) y el número de resbalones en el beam walking (B-D). Los valores son la media \pm SEM de 7-14 ratas por cada grupo. En A, C y D los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey. En B los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y un test de comparaciones múltiples de Dunnett, siendo las varianzas diferentes. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y "a" respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl_4 "a" $p < 0.05$.

4. El tratamiento con rifaximina mejora la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y en ratas con esteatohepatitis

Las ratas con esteatohepatitis (a las 6 semanas de administración crónica de CCl₄) muestran una disminución de la capacidad para aprender una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Figura 32A y B). Como se muestra en la Figura 32A, el índice de aprendizaje aumentó con los días de entrenamiento en todos los grupos, aunque en los días 6-8 las ratas CCl₄ muestran menor índice de aprendizaje, comparado con los controles. Las ratas CCl₄ necesitan un mayor número de ensayos (119 ± 7.05 comparado con 78 ± 12.4 en las controles, $p < 0.05$) para aprender la tarea. Las ratas CCl₄ tratadas con rifaximina recuperan completamente la capacidad de aprendizaje alcanzando valores similares a las controles (80 ± 12.7 ensayos, $p < 0.05$) (Figura 32B).

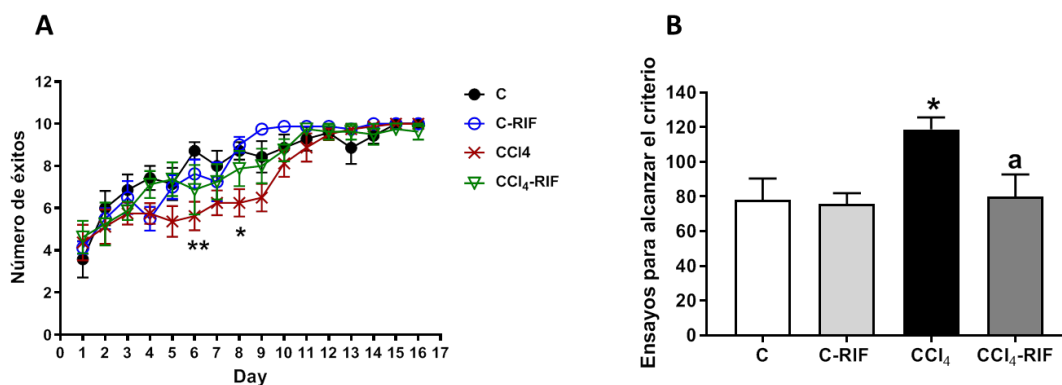


Figura 32. Las ratas con esteatohepatitis presentan menor capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y. La rifaximina mejora su capacidad de aprendizaje (A) Curva de aprendizaje en el laberinto en Y. (B) Número de ensayos necesarios para aprender la tarea. Los valores son la media \pm SEM de 7-8 ratas por cada grupo. En A y B los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y un test de comparaciones múltiples de Tukey. A: $F(15, 432) = 37.61$, **** $p < 0.0001$; B: $F(3, 432) = 8.39$, **** $p < 0.0001$. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis “a” $p < 0.05$.

5. El aprendizaje y la memoria espaciales empeoran con el grado de daño hepático. La rifaximina mejora el aprendizaje y memoria espaciales

El laberinto radial de 8 brazos permite analizar la memoria y el aprendizaje espaciales de las ratas. En concreto, se cuantificaron tres parámetros. El primero es la memoria espacial de referencia, que se analiza cuantificando las entradas del animal en brazos que no contienen comida, son errores de referencia. El segundo, relacionado con el

anterior, es el índice de aprendizaje espacial, que se extrae simplemente de restar estos errores al número total de aciertos, es decir, de entradas en brazos con comida. Y el tercer parámetro es la memoria espacial de trabajo, que se analiza cuantificando las entradas en brazos que ya han sido explorados por el animal en un mismo ensayo.

Se realizó el test en ratas con esteatohepatitis, tras 4 semanas de inyección de CCl₄ (Figura 33 A-E). Como se muestra en la Figura 33A, todos los grupos experimentales aumentaron su índice de aprendizaje a lo largo de los 4 días que duró el test. Sin embargo, el índice de aprendizaje de las ratas con esteatohepatitis a partir del día 3 se mantuvo por debajo del de las ratas control, alcanzando diferencias significativas al día 4 (3 ± 0.67 comparado con 5.8 ± 0.65 en las ratas control). El tratamiento con rifaximina mejora el índice de aprendizaje (5.45 ± 0.65) en las ratas CCl₄.

Con respecto a la memoria espacial de referencia y a la memoria espacial de trabajo no se observaron diferencias significativas entre ratas control y ratas inyectadas con CCl₄ durante 5 semanas (Figura 33 B, C, D y E), pero se observó un número menor de errores de trabajo el cuarto día de test ($p < 0.05$) en ratas CCl₄ tratadas con rifaximina comparado con ratas control tratadas con rifaximina (11.2 ± 5.23 comparado con 15.9 ± 3.98) (Figura 33 E).

La memoria y aprendizaje espaciales se analizaron también tras 7 semanas de administración de CCl₄, cuando las ratas presentaban esteatohepatitis más avanzada (Figura 33 F-J). Como se muestra en la figura 33F, todos los grupos experimentales aumentaron su índice de aprendizaje a lo largo de los 4 días que duró el test. Sin embargo, el índice de aprendizaje de las ratas CCl₄ se mantuvo por debajo del de las control, alcanzando diferencias significativas al día 4 (2.9 ± 0.52 comparado con 5.7 ± 0.65 en las controles, $p < 0.05$). El índice de aprendizaje de las ratas CCl₄ tratadas con rifaximina se mantuvo por encima del de las CCl₄, siendo significativamente mayor al día 3 (4.6 ± 0.48 comparado con 1.3 ± 0.27 , $p < 0.05$).

Las ratas CCl₄ presentan un mayor número de errores de referencia el día 3 comparado con las controles (13 ± 0.38 comparado con 9.5 ± 0.93 , $p < 0.05$), y el tratamiento con rifaximina disminuye el número de errores en las ratas CCl₄ (8.4 ± 0.71 , $p < 0.001$, comparado con CCl₄ sin rifaximina) (Figura 33H). Las ratas CCl₄ presentan un mayor número de errores de trabajo el día 2 comparado con las controles (9.6 ± 1.73 comparado con 4.7 ± 0.94 , $p < 0.05$) (Figura 33I) y mayor número de errores de trabajo totales (27.3 ± 2.02 comparado con 17.7 ± 2.31 , $p < 0.05$). El tratamiento con rifaximina

disminuye significativamente los errores de trabajo en las ratas CCl₄ (17.3 ± 2.58 , $p < 0.05$) (Figura 33J).

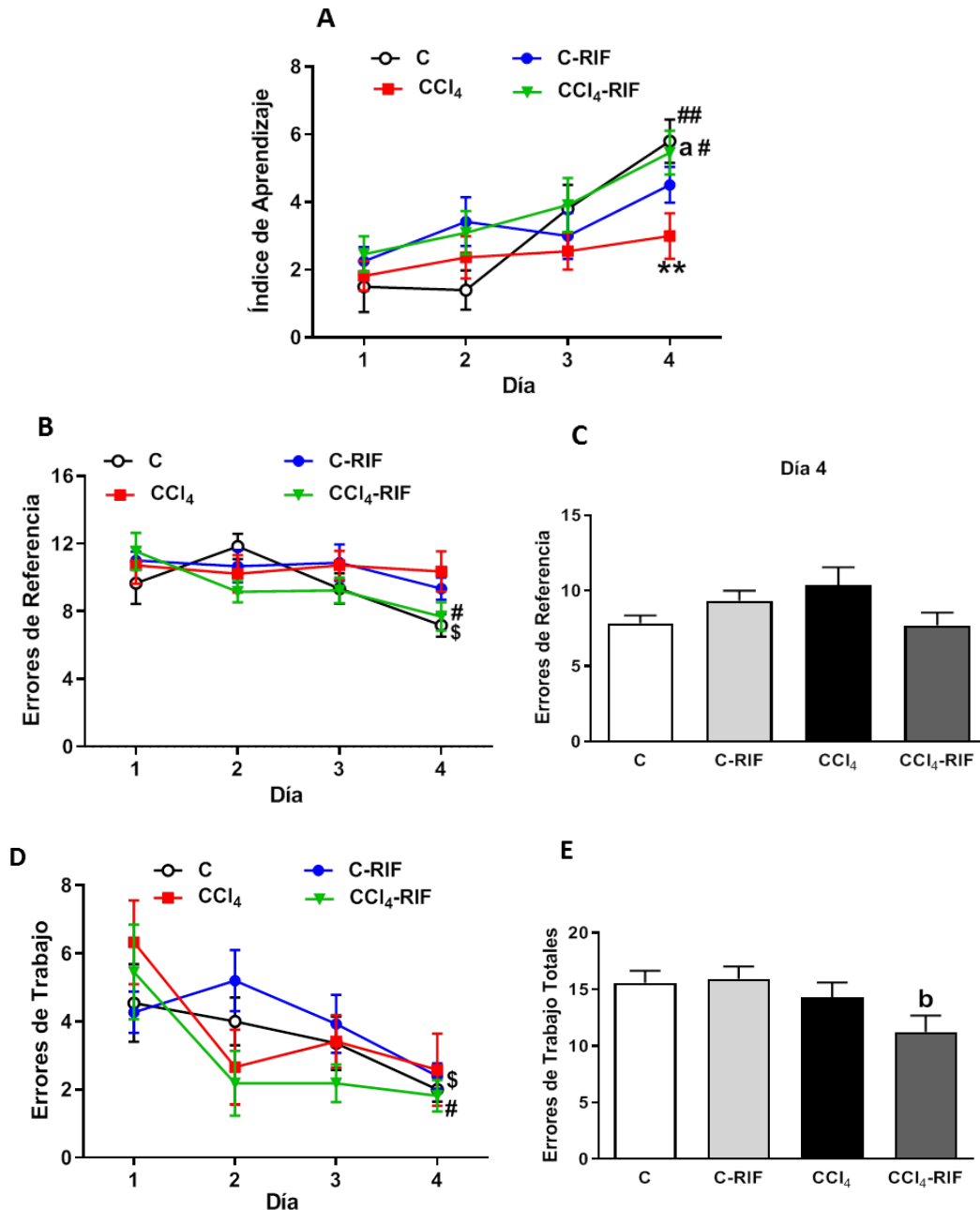
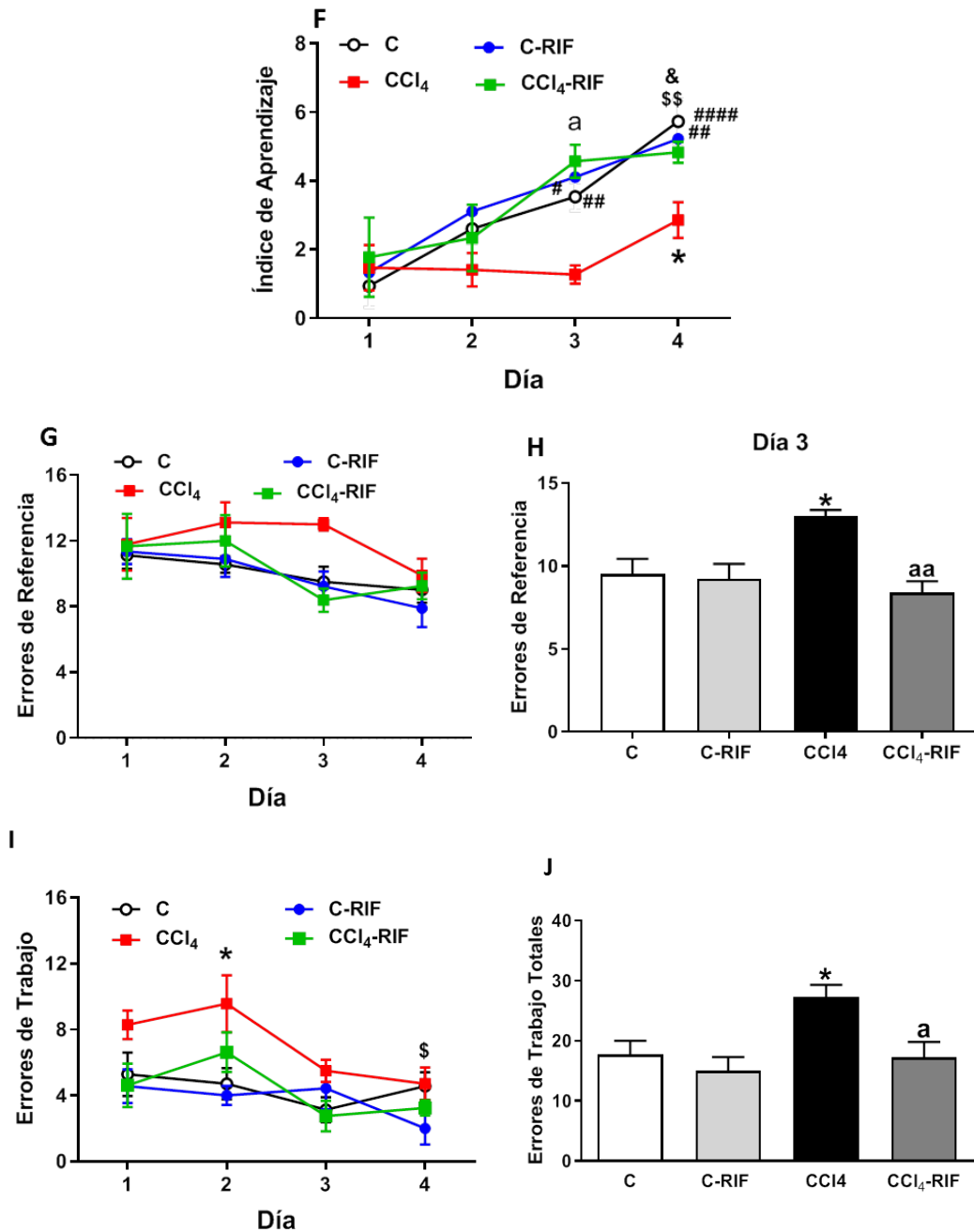


Figura 33 A-E. Las ratas con esteatohepatitis presentan un menor índice de aprendizaje en el laberinto radial. Se evaluó, en ratas control e inyectadas con CCl₄ durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el aprendizaje espacial (A), la memoria de referencia (B y C) y la memoria de trabajo (D y E) en el laberinto radial de ocho brazos. Los valores son la media \pm SEM de 10-15 ratas por grupo. En A, B y D los datos fueron analizados mediante una ANOVA de dos vías y un test de comparaciones múltiples de Sidak. A: $F(3, 57) = 9.12$ para el efecto del tiempo, $****p < 0.0001$; $F(3, 57) = 4.01$ para el efecto de la interacción grupo-tiempo, $*p < 0.05$. En C y E los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey. En las comparaciones múltiples, los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control $**p < 0.01$ y “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl₄ “a” $p < 0.05$. La “b” $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto al grupo control tratado con rifaximina. El símbolo # indica dentro del mismo grupo diferencia significativa respecto al día 1 “#” $p < 0.05$ y “##” $p < 0.01$. El símbolo \$ indica dentro del mismo grupo diferencia significativa respecto al día 2 “\$” $p < 0.05$.



F-J. Las ratas con esteatohepatitis avanzada presentan un menor índice de aprendizaje y alteración tanto de la memoria de referencia como de la de trabajo. La rifaximina mejora el aprendizaje y la memoria espacial y de trabajo. Se evaluó, en ratas inyectadas con CCl₄ durante 7 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el aprendizaje espacial (F), la memoria de referencia (G y H) y la memoria de trabajo (I y J) en el laberinto radial de ocho brazos. Los valores son la media \pm SEM de 6-15 ratas por grupo. En F, G e I los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y un test de comparaciones múltiples de Sidak. F: $F(3, 164) = 17.58$ para el efecto del tiempo, $****p < 0.0001$; $F(3, 164) = 7.049$ para el efecto del CCl₄, $***p < 0.001$. G: $F(3, 121) = 4.850$ para el efecto del tiempo, $**p < 0.01$; $F(3, 121) = 2.855$ para el efecto del CCl₄, $*p < 0.05$. I: $F(3, 99) = 5.915$ para el efecto del tiempo, $***p < 0.001$; $F(3, 99) = 7.363$ para el efecto del CCl₄, $***p < 0.001$. En H y J los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En las comparaciones múltiples, los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control $*p < 0.05$ y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$ y “aa” $p < 0.01$. El símbolo “#” indica dentro del mismo grupo diferencia significativa respecto al día 1 “#” $p < 0.05$, “##” $p < 0.01$ y “####” $p < 0.0001$. El símbolo “\$” indica dentro del mismo grupo diferencia significativa respecto al día 2 “\$” $p < 0.05$ y “\$\$” $p < 0.01$. El símbolo “&” indica dentro del mismo grupo diferencia significativa respecto al día 3 “&” $p < 0.05$.

6. El daño hepático inducido por CCl₄ altera la memoria de reconocimiento de una nueva localización. La rifaximina previene esta alteración en ratas con esteatohepatitis pero no en ratas cirróticas

Otro tipo de memoria es la de reconocimiento de novedad, que consiste en la capacidad para diferenciar un estímulo novedoso de otro familiar que ya se ha percibido con anterioridad. Para evaluar la memoria de reconocimiento en ratas nos basamos en la tendencia innata a la exploración y la atracción por estímulos novedosos que presentan las ratas y roedores en general. Dicho instinto las impulsa a explorar durante más tiempo un estímulo novedoso que otro que ya conocen. Analizamos, por un lado, la capacidad para identificar el cambio de localización espacial de un objeto (*Novel Object Location*, NOL), siendo la ratio de discriminación el cociente entre la resta del tiempo de exploración del objeto que cambia de posición y el del objeto que permanece en su posición inicial dividida por el tiempo total de exploración.

Llevamos a cabo el test del NOL tras 3, 5 y 11 semanas de administración de CCl₄ (Figura 34 A-C). Las ratas con esteatohepatitis leve tras 3 semanas de inyección de CCl₄ muestran disminución de la capacidad para identificar el cambio de localización de un objeto comparado con las ratas control (-0.11 ± 0.60 comparado con 0.21 ± 0.064 , $p < 0.05$). El tratamiento con rifaximina previene esta alteración (0.18 ± 0.045 , $p < 0.05$) (Figura 34A). De la misma forma las ratas con esteatohepatitis tras 5 semanas de inyección de CCl₄ muestran disminución de la capacidad para identificar el cambio de localización de un objeto comparado con las ratas control (-0.13 ± 0.06 comparado con 0.11 ± 0.04 , $p < 0.05$). El tratamiento con rifaximina previene esta alteración en las ratas CCl₄ (0.08 ± 0.065 , $p < 0.05$) (Figura 34B). Finalmente, las ratas con cirrosis inducida tras 11 semanas administrando CCl₄ muestran disminución significativa de la capacidad para identificar el cambio de localización de un objeto comparado con las ratas control (-0.008 ± 0.05 comparado con 0.23 ± 0.06 , $p < 0.05$), sin embargo el tratamiento con rifaximina mejora pero no llega a prevenir esta alteración (Figura 34C).

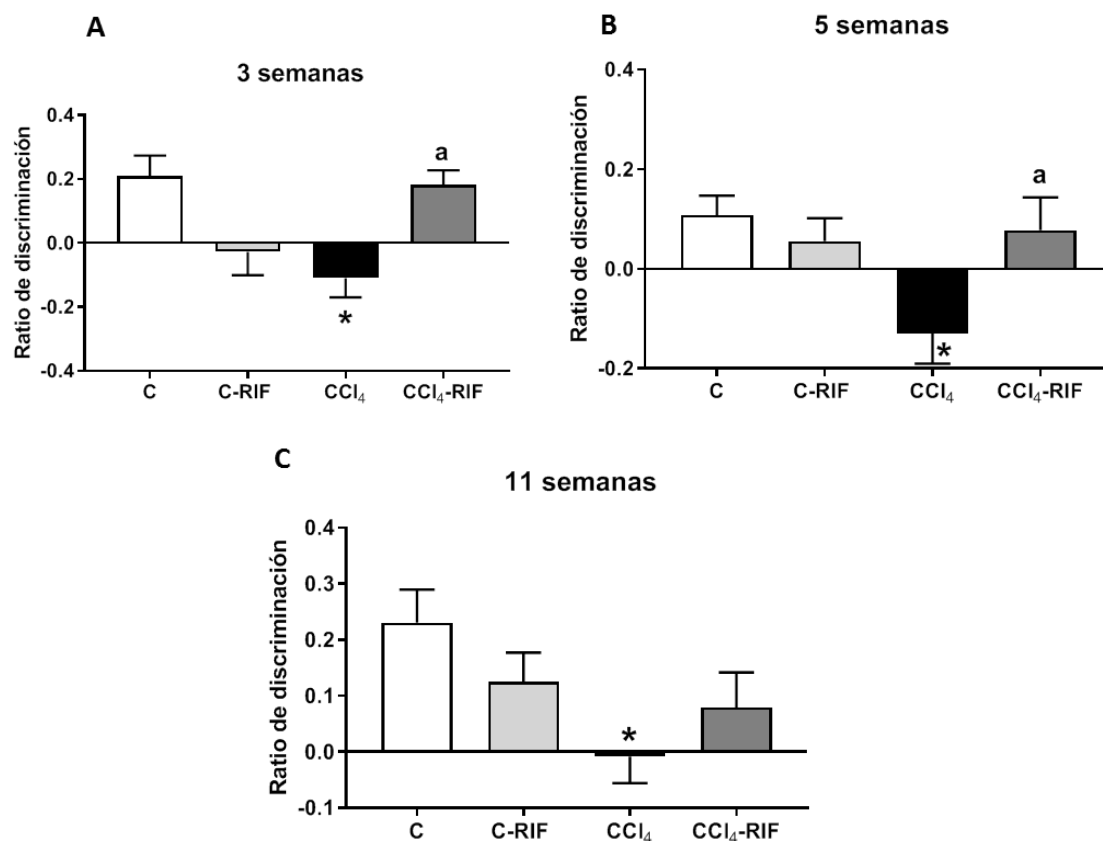


Figura 34. Las ratas con esteatohepatitis y las ratas cirróticas tienen disminuida la capacidad para identificar el cambio de localización de un objeto, y esta alteración se revierte con rifaximina en el estadio de esteatohepatitis pero no en el de cirrosis. Se evaluó, en ratas inyectadas con CCl₄ durante 3 (A), 5 (B) o 11 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, la capacidad para identificar el cambio de localización de un objeto mediante el test del NOL. Los valores son la media \pm SEM de 7-12 ratas por grupo en A y C, 9-13 ratas por grupo en B. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$ y “aa” $p < 0.01$.

7. La memoria de reconocimiento de un nuevo objeto está alterada en ratas con cirrosis hepática inducida por CCl₄ y se revierte mediante el tratamiento con rifaximina

Analizamos también la capacidad para diferenciar un objeto nuevo de otro presentado con anterioridad (*Novel Object Recognition*, NOR) (Figura 35 A-C), en ratas con diferente grado de daño hepático, definiéndose la ratio de discriminación como el cociente entre la resta del tiempo de exploración del objeto nuevo y el del objeto conocido dividida por el tiempo total de exploración.

Mientras que las ratas con esteatohepatitis, tanto leve como avanzada, no presentan alterada la capacidad para diferenciar un objeto nuevo de otro presentado con

anterioridad (Figura 35 A-B), esta capacidad se ve significativamente disminuida en ratas cirróticas (0.42 ± 0.03 comparado con 0.59 ± 0.03 , $p < 0.05$), y mejora significativamente mediante el tratamiento con rifaximina (0.64 ± 0.053 , $p < 0.001$) (Figura 35 C).

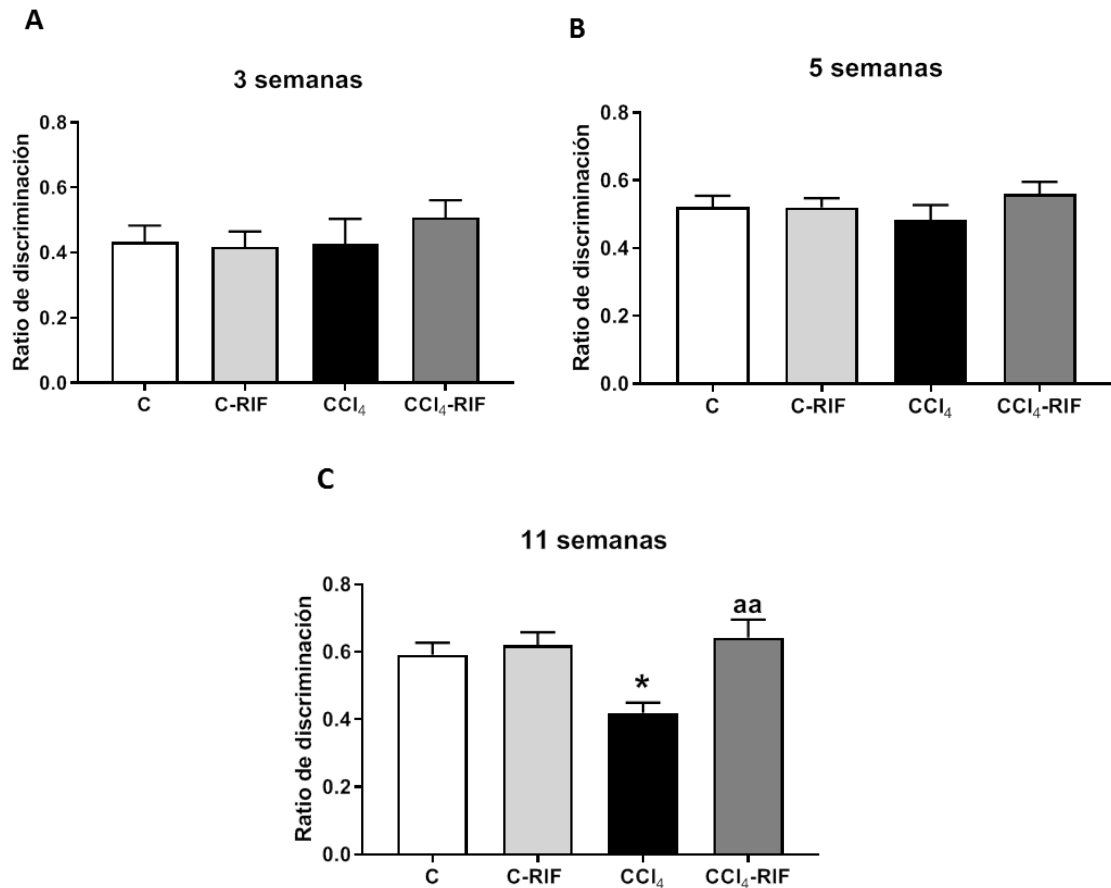


Figura 35. Las ratas con cirrosis, pero no con esteatohepatitis, presentan disminuida la capacidad para identificar un objeto nuevo y la rifaximina mejora esta capacidad. Se evaluó, en ratas inyectadas con CCl₄ durante 3 (A), 5 (B) o 11 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, la capacidad para identificar un objeto nuevo, mediante el test del NOR. Los valores son la media \pm SEM de 4-7 ratas por grupo en A, 12-14 ratas por grupo en B y 10-12 ratas por grupo en C. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$ y “aa” $p < 0.01$.

8. Alteraciones de la neurotransmisión y neuroinflamación en cerebelo

8.1 La esteatohepatitis induce aumento de los niveles extracelulares de GABA y glutamato en cerebelo que se previene con el tratamiento con rifaximina

Analizamos si las alteraciones en la coordinación motora fuesen debidas a alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica en el cerebelo. Medimos en muestras obtenidas por microdiálisis *in vivo* los niveles extracelulares de glutamato y GABA en cerebelo (Figura 36). Las ratas con esteatohepatitis, tras inyección de CCl₄ durante 4 semanas, tienen aumentados los niveles extracelulares de glutamato (19 ± 1.7 frente a 14 ± 1.1 μ M, $p < 0.05$) (Figura 36A) y GABA (24 ± 3.6 frente a 14 ± 1.5 nM, $p < 0.05$) (Figura 36B) en el cerebelo. El tratamiento con rifaximina previene significativamente el aumento tanto de glutamato (13 ± 1.6 μ M, $p < 0.05$) como de GABA (16 ± 1.7 nM, $p < 0.05$). Además, el grupo control tratado con rifaximina presenta aumento de los niveles extracelulares de GABA en cerebelo comparado con el grupo control (37 ± 8.7 frente a 14 ± 1.5 nM, $p < 0.05$) y con el grupo CCl₄ tratado con rifaximina ($p < 0.05$).

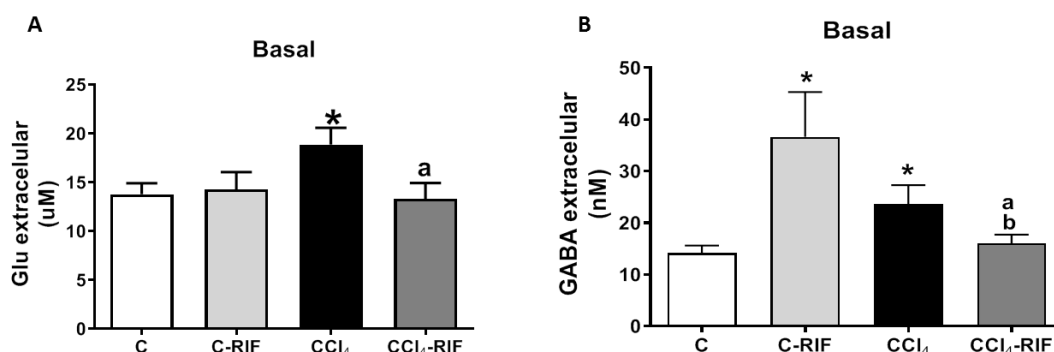


Figura 36. Las ratas con esteatohepatitis presentan aumento de los niveles extracelulares de GABA y glutamato en cerebelo. Estos niveles disminuyen con el tratamiento con rifaximina. Se midieron, en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, los niveles extracelulares de glutamato (Figura A) y GABA (Figura B) en cerebelo. Los valores son la media \pm SEM de 8-13 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl₄ “a” $p < 0.05$ y “b” respecto al grupo control tratado con rifaximina “b” $p < 0.05$.

8.2 Alteración de la expresión en membrana de los transportadores de glutamato y GABA en cerebelo en ratas con distintos grados de fallo hepático. Efectos de la rifaximina

Analizamos si la variación de los niveles extracelulares de glutamato y GABA en cerebelo estuviera asociada a la alteración de la expresión en membrana de sus transportadores. Para ello analizamos la expresión en membrana del transportador de glutamato GLAST y de los transportadores de GABA GAT1 y GAT3 en ratas con esteatohepatitis y en ratas cirróticas, a las 4 y 12 semanas, respectivamente.

Las ratas con esteatohepatitis tienen disminuida la expresión en membrana de GLAST en cerebelo (50 ± 7.7 % de los controles, $p < 0.01$). La rifaximina previene esta alteración en ratas CCl₄ (89 ± 8.6 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 37A). Tras 12 semanas de inyección de CCl₄ la expresión en membrana de GLAST permanece disminuida (41 ± 16.9 % de los controles, $p < 0.05$), y la rifaximina previene esta alteración (87 ± 13.6 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 37B).

Con respecto a los transportadores de GABA, las ratas con esteatohepatitis muestran disminuida la expresión en membrana de GAT1 en cerebelo (31 ± 15 % de los controles, $p < 0.01$). El tratamiento con rifaximina restaura la expresión en membrana hasta valores control (129 ± 11 %, $p < 0.01$) (Figura 37C). Las ratas con cirrosis hepática muestran disminución de la expresión en membrana de GAT1 en cerebelo (21.8 ± 14.1 % de los controles, $p < 0.01$) la cual aumenta mediante el tratamiento con rifaximina (126 ± 20 % de los controles, $p < 0.001$) (Figura 37D). El contenido total de GAT3 en cerebelo está aumentado en ratas con esteatohepatitis (131 ± 10 % de los controles, $p < 0.05$), y esta alteración se previene mediante el tratamiento con rifaximina (96 ± 12 %, $p < 0.05$) (Figura 37E). En el estadio de cirrosis no se observa alteración en la expresión en membrana de GAT3. Sin embargo, la rifaximina disminuye su expresión en membrana en las ratas cirróticas (34 ± 9 % de los controles, $p < 0.001$) (Figura 37F).

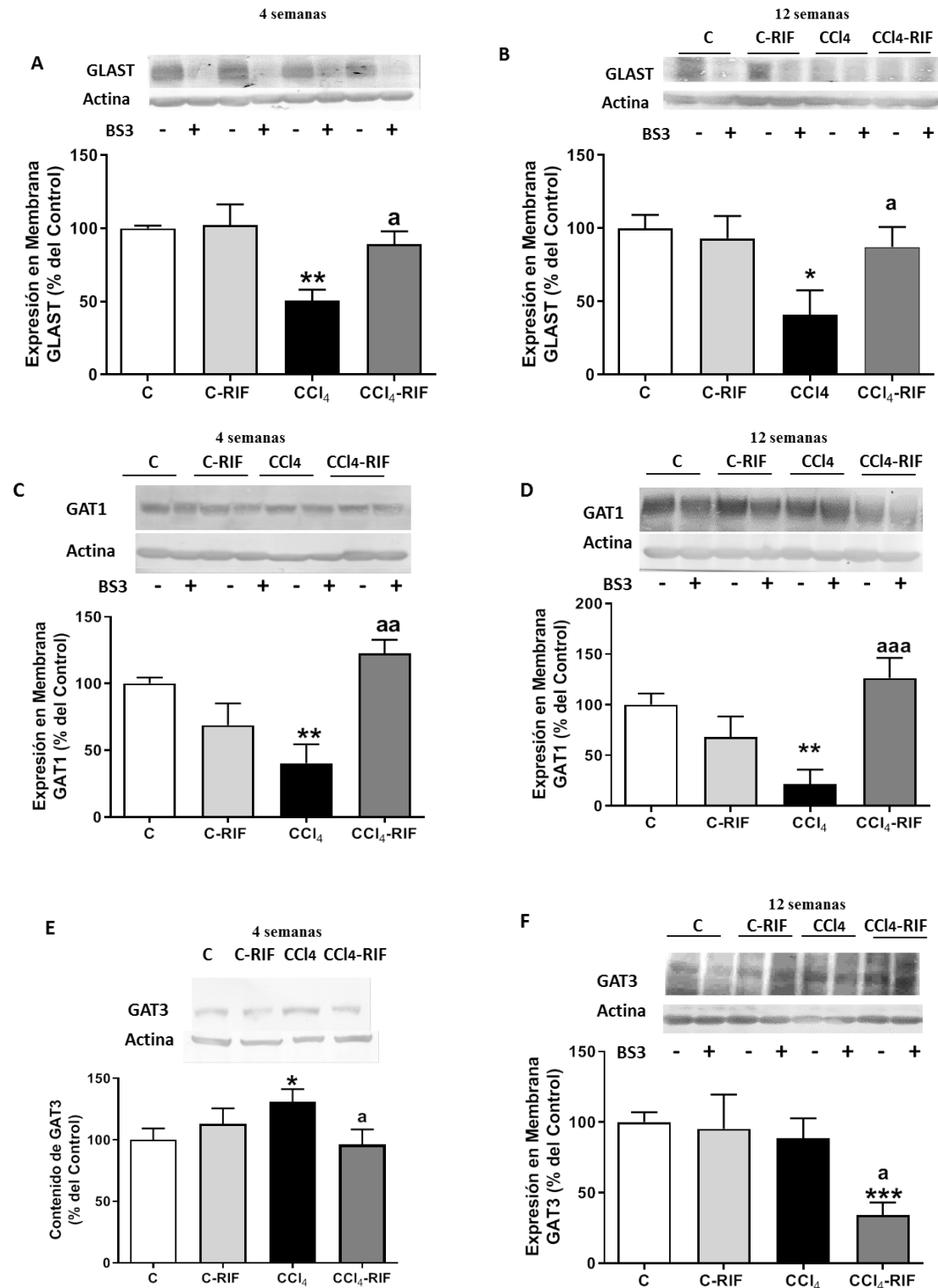


Figura 37. Las ratas con daño hepático inducido por CCl₄ tienen alterada la expresión en membrana de los transportadores de glutamato y GABA. Se analizó en el cerebro de ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 y 12 semanas, y tratadas con rifaximina o con su vehículo, la expresión en membrana de GLAST (A, B), GAT1 (C, D) y GAT3 (F) y el contenido total de GAT3 (E). Los valores son la media \pm SEM de 7-8 ratas por grupo en A, 10-13 en B, 6-9 en C, 8-13 en D, 10-14 en E, 8-9 en F. En A y F los datos fueron analizados mediante un Welch's test ANOVA y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En B, C, D y E los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001, y "a" respecto a las ratas con daño hepático inducido por CCl₄ "a" p <0.05, "aa" p <0.01, "aaa" p <0.001.

8.3 El daño hepático induce neuroinflamación en el cerebelo.

Efectos de la rifaximina

Analizamos si las alteraciones en la neurotransmisión en cerebelo estuviesen asociadas a neuroinflamación en esta área. Para ello analizamos activación de microglía y astrocitos en el cerebelo de ratas con distintos grados de daño hepático. Las ratas con daño hepático muestran activación de la microglía en sustancia blanca de cerebelo, tal como revela la morfología de la microglía teñida con anti-IBA-1, tras 2 (133 ± 5.8 frente a $158 \pm 6.1 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (Figura 38 A y E), 4 (143 ± 4.3 frente a $206 \pm 8.2 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 38 B y F), 8 (176 ± 5.7 frente a $207 \pm 7.0 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (Figura 38 C y G) y 12 (171 ± 5.7 frente a $228 \pm 6.7 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 38 D y H) semanas de administración de CCl_4 , es decir, durante todos los estadios de daño hepático. El tratamiento con rifaximina revierte completamente la activación de la microglía a 4 ($212 \pm 8 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 38 B y F) y 8 ($231 \pm 10.4 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 38 C y G), pero no a 2 semanas, en ratas con esteatohepatitis (Figura 38 A y E). A 12 semanas, en ratas con cirrosis hepática, la rifaximina disminuye la activación de la microglía, pero sin alcanzar los valores control ($201 \pm 8 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (Figura 38 D y H) semanas. A las 12 semanas de tratamiento la rifaximina también induce activación de la microglía en el grupo control ($203 \pm 8 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (Figura 38 D y H).

Las ratas con daño hepático muestran activación de astrocitos (aumento del área teñida por GFAP) en sustancia blanca del cerebelo a partir de la semana 4 (119 ± 2.2 % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 39 B y F) de administración de CCl_4 . Esta activación se mantiene a 8 (109 ± 2.3 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 39 C y G) y 12 (113 ± 2.6 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 39 D y H) semanas. El tratamiento con rifaximina previene la activación astrocitaria a 4 (108 ± 2.3 % de los controles, $p < 0.001$) (Figura 39 B y F), 8 (93 ± 2.8 % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 39 G) y 12 (82 ± 2.0 % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 39 D y H) semanas.

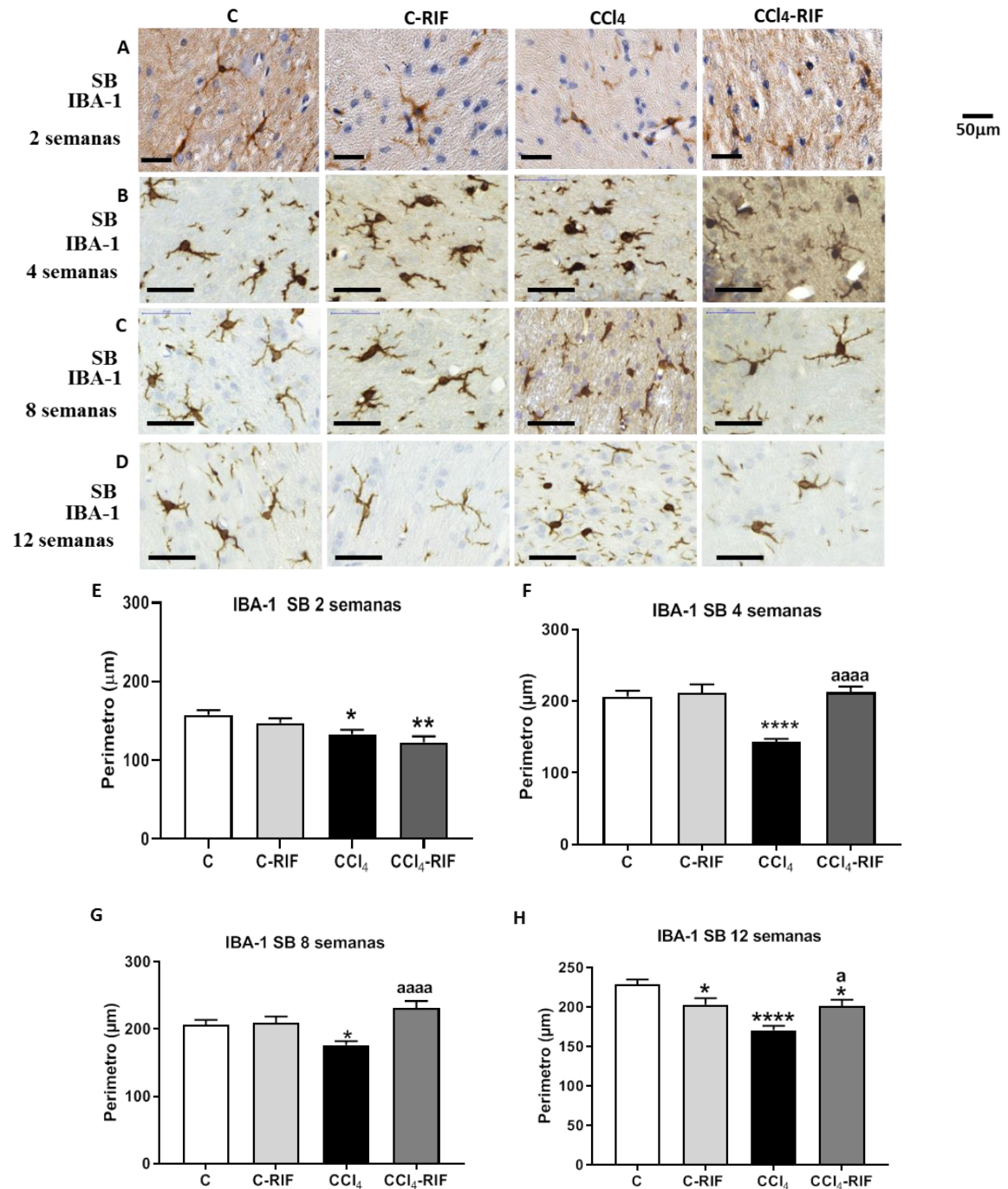


Figura 38. Las ratas con daño hepático presentan activación de la microglía en sustancia blanca (SB) del cerebelo que se previene con el tratamiento con rifaximina en los estadios de esteatohepatitis y esteatohepatitis avanzada y disminuye en el estadio de cirrosis. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, F), 4 (B, E), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el perímetro de la microglía teñida por inmunohistoquímica con anti-IBA-1. Los valores son la media \pm SEM de 4-7 ratas por grupo. En E y G los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En F los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. EN H los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ y "a" respecto a las ratas CCl₄ "a" $p < 0.05$, "aaaa" $p < 0.0001$.

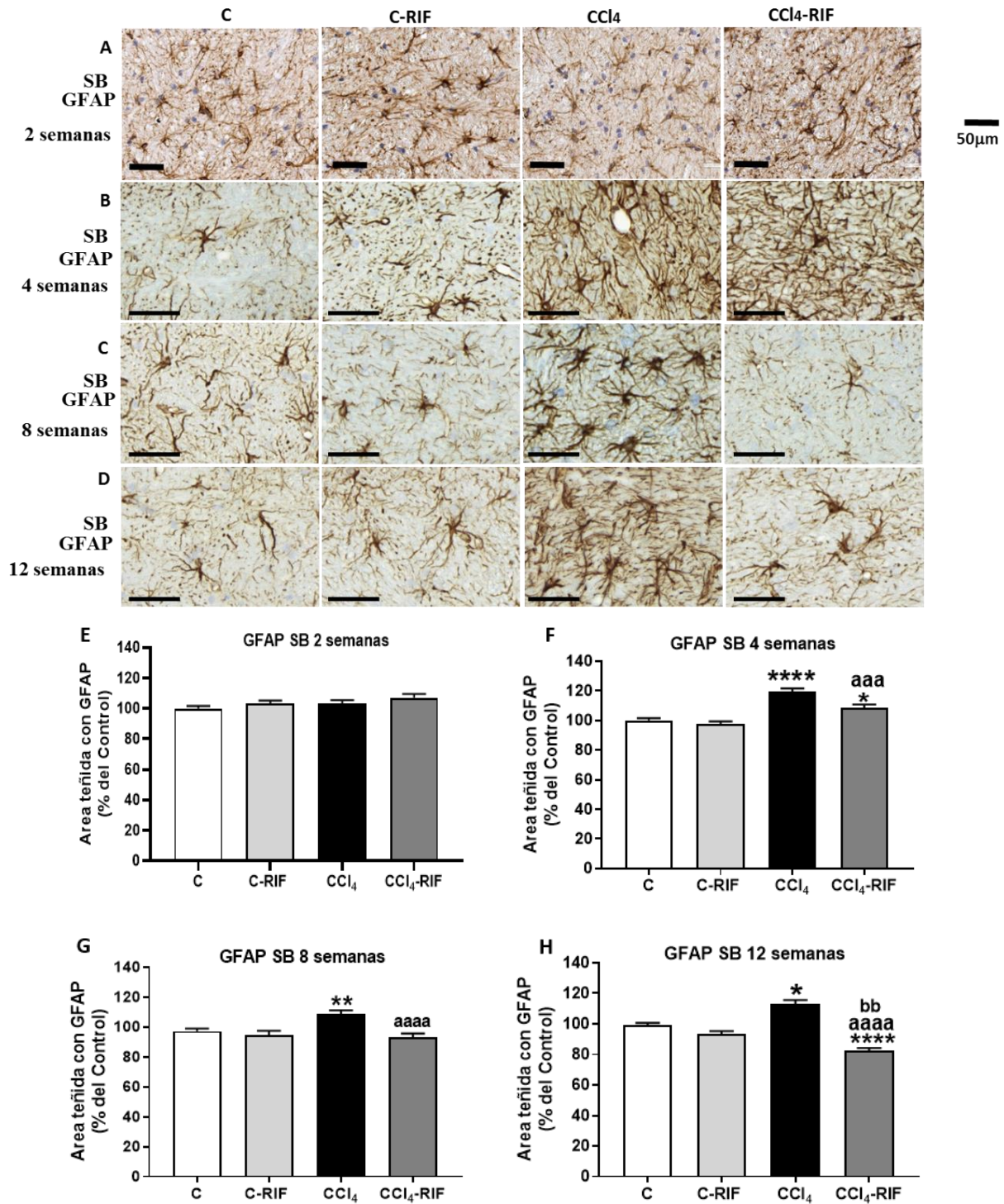


Figura 39. Las ratas con daño hepático presentan activación de astrocitos en sustancia blanca (SB) del cerebelo que se previene con el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el porcentaje de área teñida por inmunohistoquímica con anti-GFAP. Los valores son la media \pm SEM de 4-6 ratas por grupo. En E y G los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En F los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En H los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, "a" respecto a las ratas CCl₄ "aaa" $p < 0.001$, "aaaa" $p < 0.0001$ y "b" respecto al grupo control tratado con rifaximina "bb" $p < 0.01$.

8.4 El daño hepático induce aumento de TNF α en cerebelo, el cual se previene mediante el tratamiento con rifaximina en el estadio de esteatohepatitis pero no en el de esteatohepatitis avanzada y cirrosis

Analizamos los niveles de TNF α , los cuales deben aumentar debido a la activación de microglía y astrocitos.

Analizamos por inmunohistoquímica el contenido de TNF α en neuronas del Purkinje y en sustancia blanca, y por *western blot* el contenido total de TNF α en cerebelo.

A las 2 semanas de inyección de CCl₄ no se observa ninguna diferencia entre grupos ni en neuronas de Purkinje (Figura 40 A y E) ni en sustancia blanca (Figura 40 I y M) ni en el cerebelo entero (Figura 40Q). Tras 4 semanas se observa aumento del contenido de TNF α tanto en neuronas de Purkinje (45 ± 2.8 u.a. (unidades arbitrarias) comparado con 35 ± 2.2 u.a., $p < 0.05$) (Figura 40 B y F) como en sustancia blanca (274 ± 34.1 células/mm² comparado con 106 ± 8.0 células/mm², $p < 0.001$) (Figura 40 J y N), y en el cerebelo entero (157 ± 12 % del control, $p < 0.01$) (Figura 40R). En todos los casos el aumento en la expresión de TNF α en el estadio de esteatohepatitis se previene mediante el tratamiento con rifaximina (35 ± 1.8 u.a. $p < 0.05$; 155 ± 23.6 células/mm², $p < 0.05$; 104 ± 13 % del control, $p < 0.01$; respetivamente). Tras 8 semanas en contenido de TNF α sigue aumentado tanto en neuronas de Purkinje (36 ± 2.2 u.a comparado con 26 ± 1.4 u.a., $p < 0.01$) (Figura 40 C y G) como en sustancia blanca (159 ± 17.9 células/mm² comparado con 92 ± 10.5 células/mm², $p < 0.05$) (Figura 40 K y O). En el estadio de esteatohepatitis avanzada el tratamiento con rifaximina disminuye el aumento en la expresión de TNF α , pero no consigue revertirlo (31 ± 20.1 u.a. n.s.; 113 ± 17.9 células/mm², n.s; respetivamente). A las 12 semanas de inyección de CCl₄ el contenido de TNF α sigue estando aumentado tanto en tanto en neuronas de Purkinje (29 ± 1.1 u.a comparado con 24 ± 1.3 u.a., $p < 0.05$) (Figura 40 D y H) como en sustancia blanca (190 ± 14.5 células/mm² comparado con 121 ± 12.4 células/mm², $p < 0.01$) (Figura 40 L y P). El tratamiento con rifaximina no consigue revertir este aumento en ninguna de las dos capas analizadas (31 ± 1.7 u.a, $p < 0.05$; 186 ± 12.2 células/mm², $p < 0.01$; respetivamente). En el estadio de cirrosis también se observa un aumento del contenido de TNF α en las neuronas del Purkinje en el grupo control rifaximina (30 ± 1.4 u.a, $p < 0.01$).

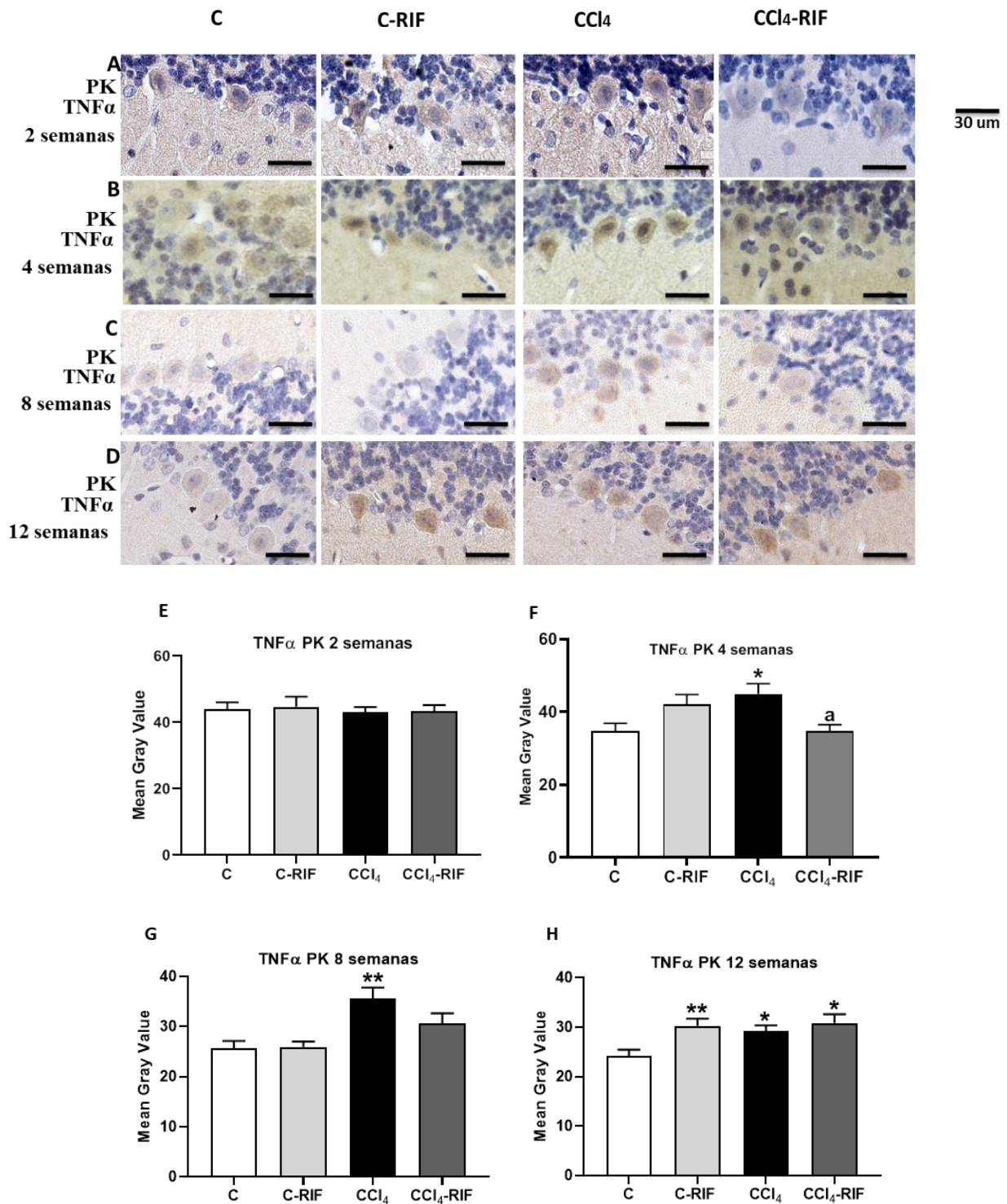


Figura 40 A-H. Las ratas con daño hepático tienen aumentado el contenido de TNF α en neuronas de Purkinje (PK) y la rifaximina previene este aumento en el estadio de esteatohepatitis. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A y E) ,4 (B y F) 8 (C y G) y 12 (D y H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de TNF α neuronas de Purkinje (PK) por inmunohistoquímica. Los valores son la media \pm SEM de 3-5 ratas por grupo. En E y G los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En F y H los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En P, Q y R los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05, **p<0.01, y "a" respecto a las ratas CCl₄ "a" p<0.05, "aa" p<0.01.

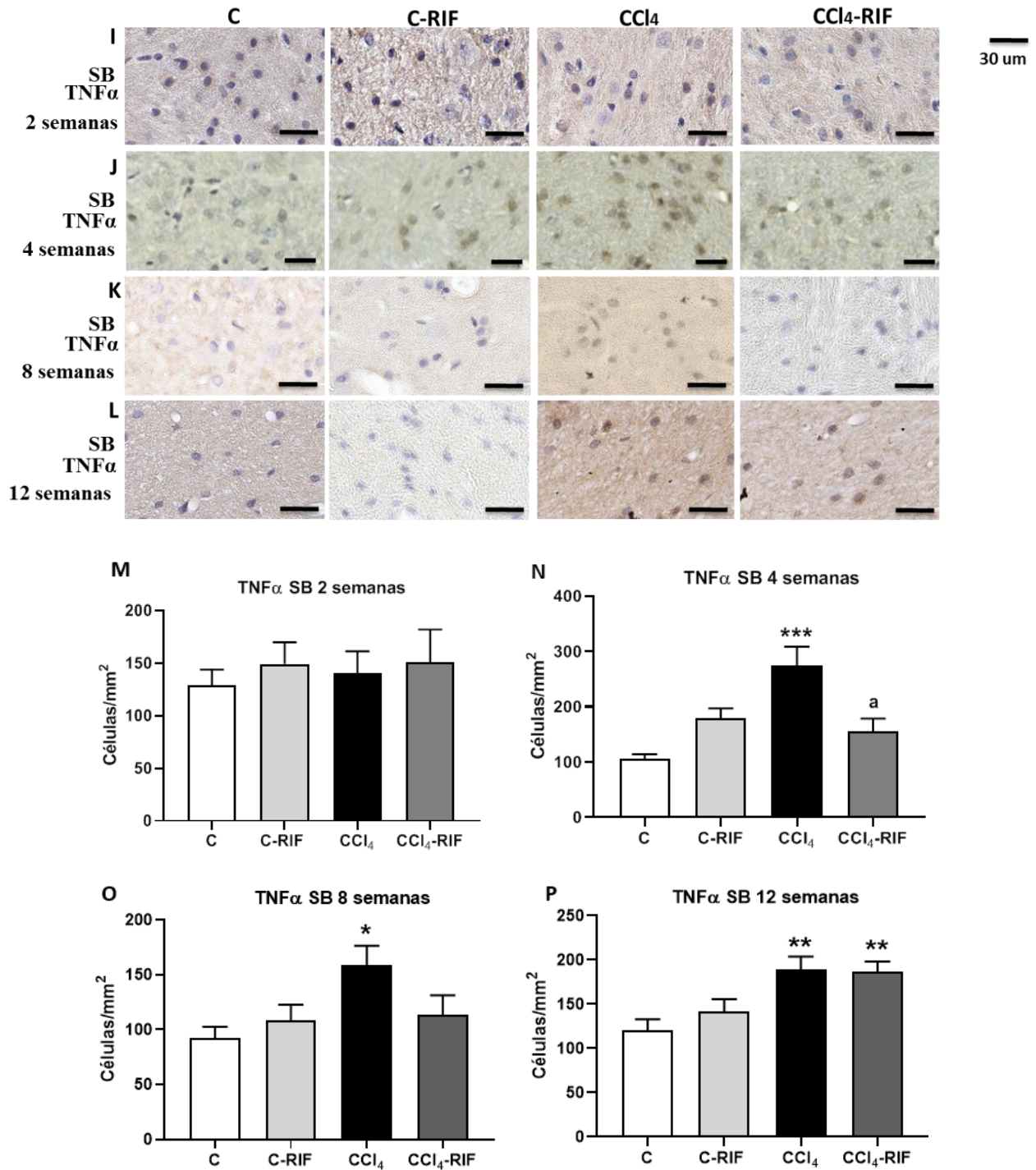


Figura 40 I-P. Las ratas con daño hepático tienen aumentado el contenido de TNF α en sustancia blanca (SB) del cerebelo y la rifaximina previene este aumento en el estadio de esteatohepatitis. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (I y M) 4 (J y N) 8 (K y O) y 12 (L y P) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de TNF α en sustancia blanca (SB) del cerebelo por inmunohistoquímica. Los valores son la media \pm SEM de 3-5 ratas por grupo. En M, N y O los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En P los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” p<0.05, “aa” p<0.01.

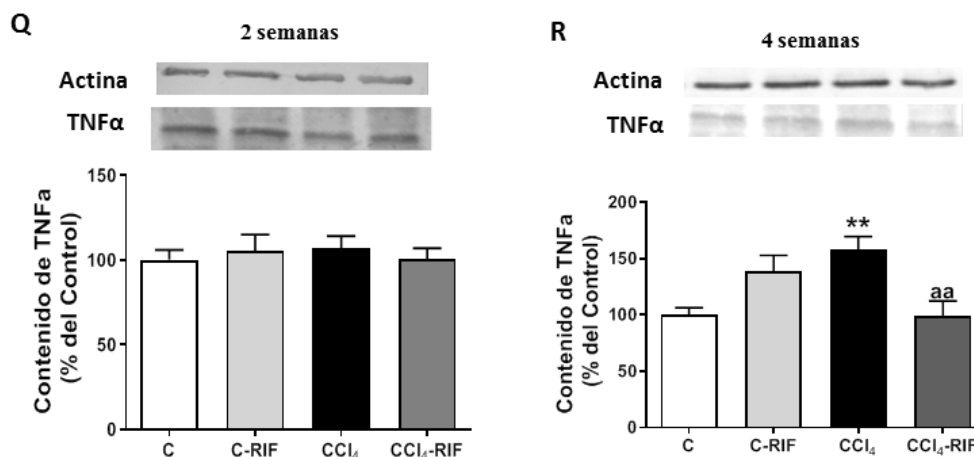


Figura 40 Q-R. Las ratas con esteatohepatitis tienen aumentado el contenido de TNFα en cerebelo y la rifaximina previene este aumento. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (Q) y 4 (R) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de TNFα en cerebelo por *western blot*. Los valores son la media ± SEM de 12-16 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control, **p<0.01, y “a” respecto a las ratas CCl₄, “aa” p<0.01.

8.5 El daño hepático induce pérdida neuronal en el cerebelo.

Efectos de la rifaximina

Evaluamos si la neuroinflamación está asociada con pérdida de neuronas de Purkinje y granulares.

A las 2 semanas hay una disminución significativa de la densidad celular de las neuronas granulares (51 ± 1.2 comparado con 56 ± 0.9 % de área teñida en las controles, $p<0.01$) (Figura 41 A y E) pero no en neuronas de Purkinje (Figura 42 A y E). A las 4 semanas, la pérdida neuronal en la capa granular aumenta incluso más (47 ± 0.6 comparado con 52 ± 0.5 % de área teñida, $p<0.001$), pero se detiene por completo con tratamiento con rifaximina (52 ± 0.6 % de área teñida, $p<0.001$) (Figura 41 B y F). Al mismo tiempo se verifica una pérdida de neuronas de Purkinje (16 ± 0.6 comparado con 18 ± 0.6 células/mm, $p<0.05$), que se previene con el tratamiento con rifaximina (18 ± 0.6 células/mm, $p<0.01$) (Figura 42 B y F). A las 8 semanas hay pérdida neuronal tanto en la capa granular (45 ± 0.6 comparado con 48 ± 0.6 % de área teñida, $p<0.001$) (Figura C y G) como en las neuronas de Purkinje (14 ± 0.6 comparado con 16 ± 0.6 células/mm, $p<0.05$) (Figura 42 C y G), que en ambos caso se previene mediante el tratamiento con rifaximina (respectivamente 48 ± 0.5 % de área teñida, $p<0.01$ y 17 ± 0.6 células/mm, $p<0.001$). A 12 semanas la pérdida neuronal se mantiene tanto en la capa granular (47 ± 0.7 comparado con 51 ± 0.6 % de área teñida, $p<0.05$) (Figura 41 D y H)

como en neuronas de Purkinje (14 ± 0.5 comparado con 19 ± 0.6 células/mm, $p < 0.0001$) (Figura 42 D y H). En la capa granular el tratamiento con rifaximina induce pérdida neuronal tanto en las ratas control (46 ± 0.6 % de área teñida, $p < 0.0001$) como en las CCl_4 (43 ± 0.7 % de área teñida, $p < 0.0001$) (Figura 41 D y H), mientras que previene la pérdida neuronal en neuronas de Purkinje (16.7 ± 0.55 células/mm, $p < 0.05$) (Figura 42 D y H).

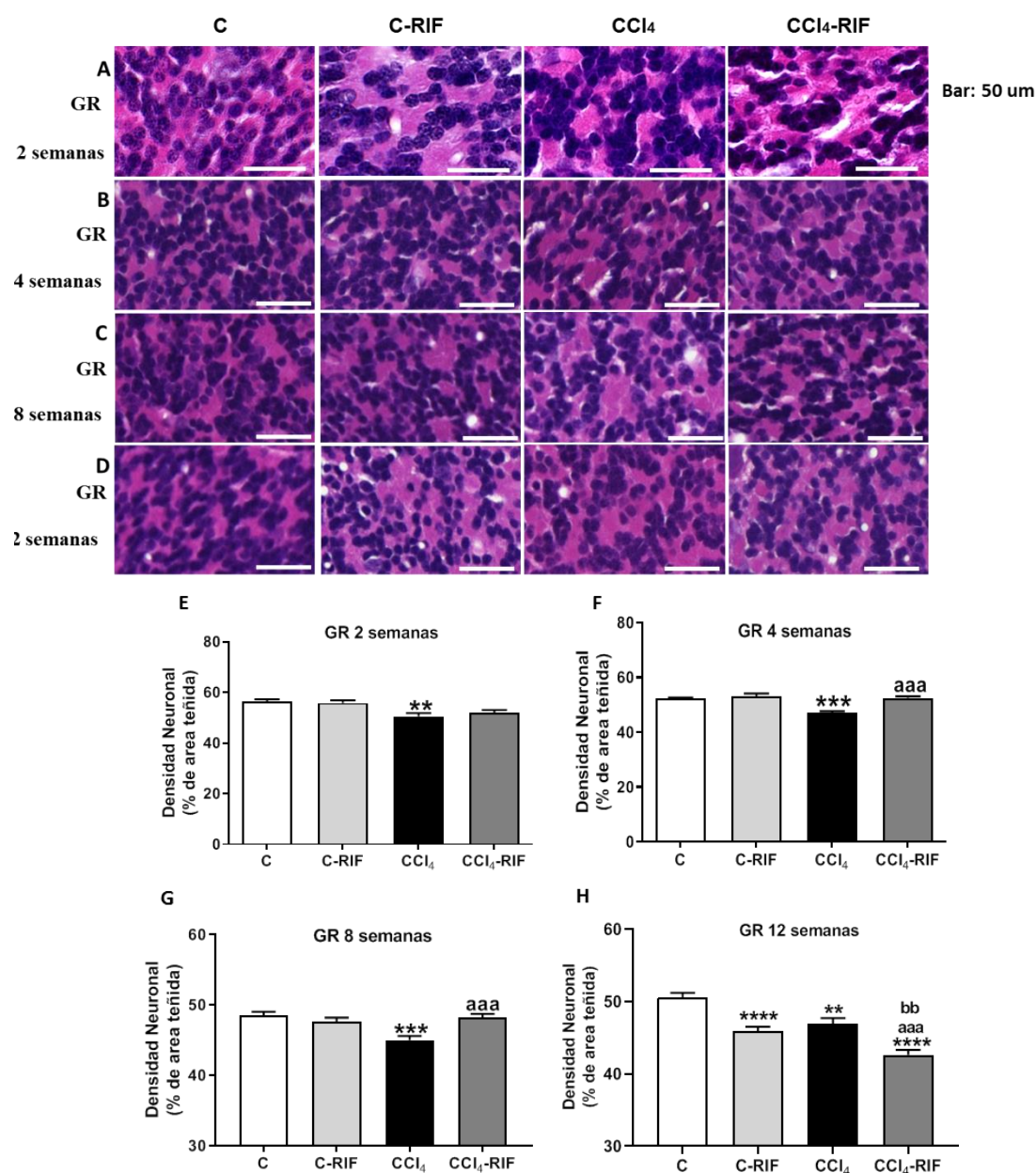


Figura 41. Las ratas con fallo hepático inducido por CCl_4 presentan pérdida neuronal en capa granular. Efectos del tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl_4 durante 2 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la densidad de las neuronas granulares (GR) mediante una tinción con hematoxilina-eosina. Los valores son la media \pm SEM de 2-6 ratas por grupo. En E y H los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En F los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En G los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, "a"

respecto a las ratas CCl₄ “aaa” $p < 0.001$ y “b” respecto al grupo control tratado con rifaximina “bb” $p < 0.01$.

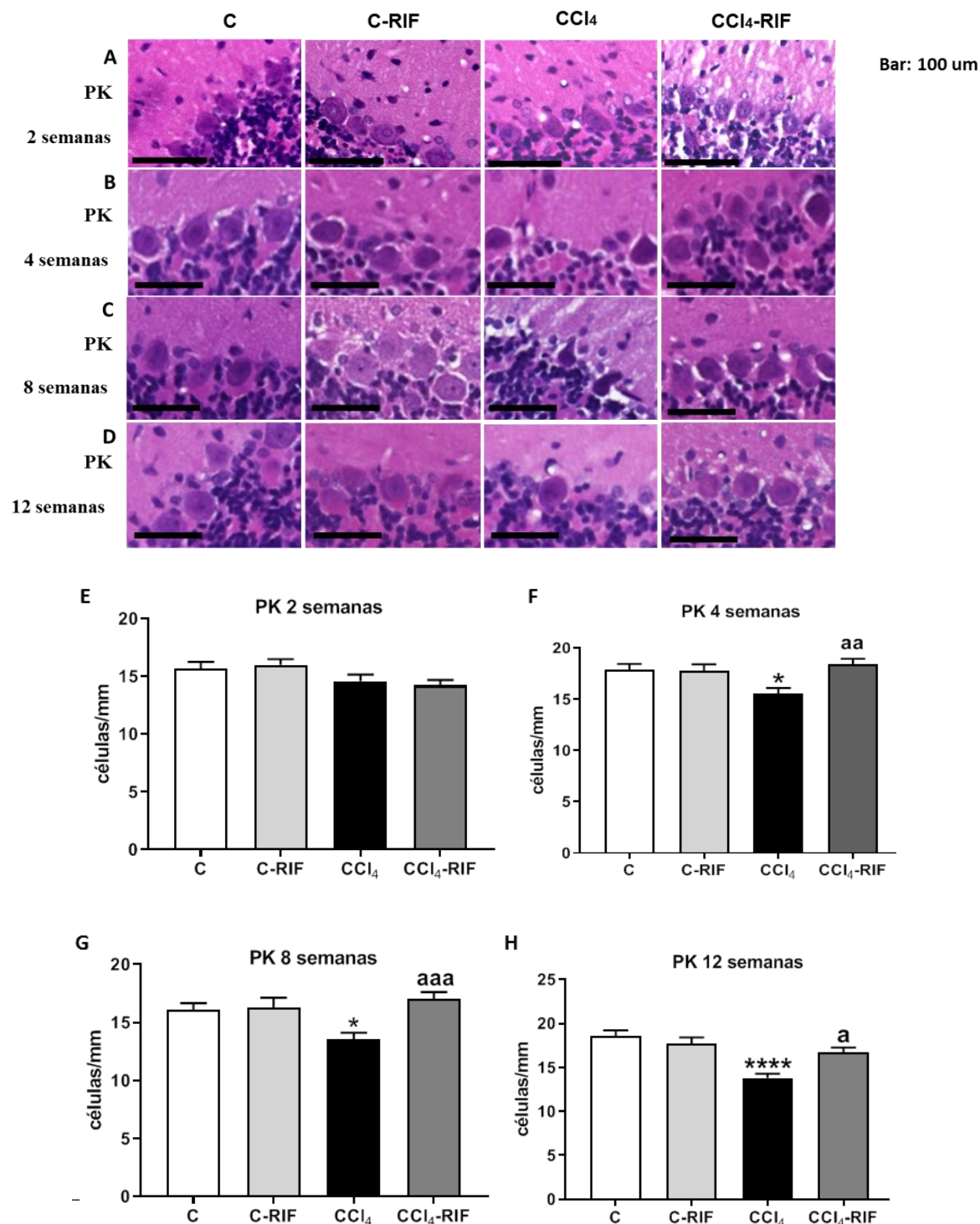


Figura 42. Las ratas con fallo hepático crónico inducido por CCl₄ presentan pérdida de neuronas de Purkinje que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la densidad de las neuronas de Purkinje (PK) teñidas con hematoxilina-eosina. Los valores son la media \pm SEM de 4-6 ratas por grupo. En E, F y G los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En F los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican

diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$, “aa” $p < 0.01$, “aaa” $p < 0.001$.

9. Alteraciones de la neurotransmisión y neuroinflamación en hipocampo

9.1 Alteración de la expresión en membrana de subunidades de los receptores AMPA, NMDA y GABA en hipocampo de ratas con distintos grados de fallo hepático. Efectos de la rifaximina

Analizamos si las alteraciones en la memoria y aprendizaje espaciales fuesen debidas a alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica en el hipocampo. Para ello analizamos la expresión en membrana de subunidades de los receptores de glutamato AMPA y NMDA y del receptor GABA tras 4, 8 y 12 semanas de administración de CCl₄.

La expresión en membrana de la subunidad GLUA1 de los receptores AMPA no se ve alterada tras 4 semanas de administración de CCl₄ (Figura 43A), mientras que aumenta en ratas con esteatohepatitis avanzada (161 ± 16.9 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 43B) y cirrosis (166 ± 17.6 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 43C). El tratamiento con rifaximina induce un mayor aumento a 8 semanas (173 ± 20.1 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 43B) y una leve disminución que pero no llega a ser significativa a 12 semanas (146 ± 17.5 % de los controles, n.s.) (Figura 43C).

Con respecto a la expresión en membrana de la subunidad GLUA2 de los receptores AMPA su expresión en membrana aumenta significativamente en ratas con daño hepático a las 4 (171 ± 26.3 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 44A) y 12 semanas (159 ± 21.4 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 44C), pero no a las 8 semanas, respecto al grupo control. La rifaximina no tiene efecto a las 4 semanas pero reduce significativamente la expresión en membrana a las 12 semanas en el grupo CCl₄ (74 ± 12.3 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 44C). En las ratas control tratadas con rifaximina aumenta significativamente la expresión en membrana de GluA2 a las 4 semanas de administración de CCl₄ (227 ± 43.1 % de los controles, $p < 0.05$).

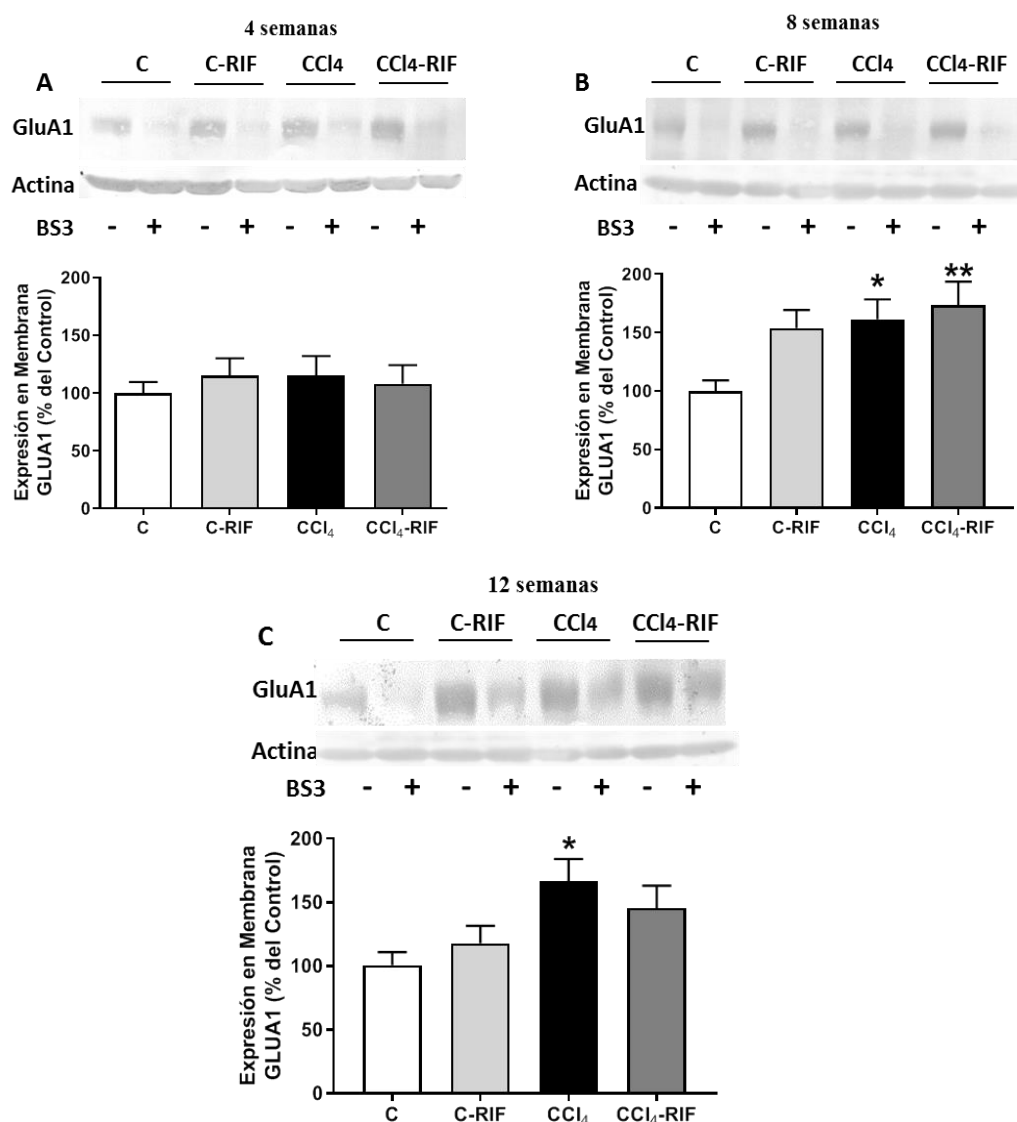


Figura 43. Las ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis tienen aumentada la expresión en membrana de GLUA1 en hipocampo, y la rifaximina no previene este aumento. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ y tratadas con rifaximina o con su vehículo la expresión en membrana de GLUA1 en hipocampo a las 4 (A), 8 (B) y 12 semanas (C) de administración de CCl₄. Los valores son la media \pm SEM de 10-18 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

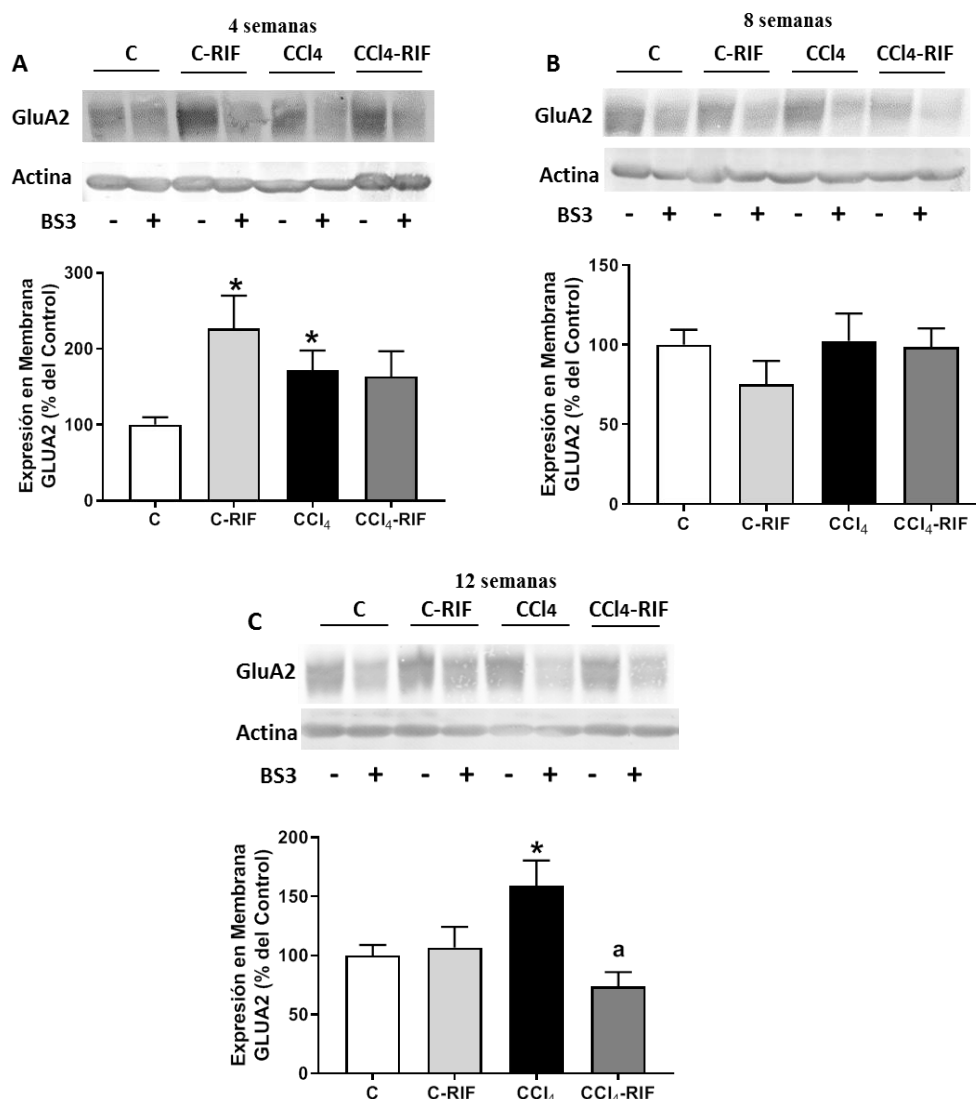


Figura 44. La expresión en membrana de GLUA2 en hipocampo está aumentada a 4 y 12 semanas y la rifaximina la disminuye a 12 semanas. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 (A), 8 (B) y 12 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la expresión en membrana de GLUA2 en hipocampo. Los valores son la media \pm SEM de 8-16 ratas por grupo. En A y C los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En B los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * p <0.05, ** p <0.001. Las "a" indican diferencia significativa respecto a las ratas CCl₄ "a" p <0.05.

La expresión en membrana de la subunidad NR1 de los receptores NMDA disminuye en ratas con esteatohepatitis (61 ± 8.1 % de los controles, p <0.05) (Figura 45A), y esta alteración se previene mediante el tratamiento con rifaximina (109 ± 13.5 % de los controles, p <0.05). Tras 8 semanas de inyección de CCl₄ no se observan diferencias significativas comparado con el control (Figura 45B). En ratas cirróticas se verifica una disminución de la expresión en membrana de NR1 (48 ± 7.9 % de los controles, p <0.01) (Figura 45C) que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina (45 ± 14 % de

los controles, $p < 0.01$). El tratamiento con rifaximina aumenta significativamente la expresión en membrana de NR1 en las ratas control o CCl₄ a 4 y 8 semanas de administración de CCl₄ ($p < 0.05$ en todos los casos).

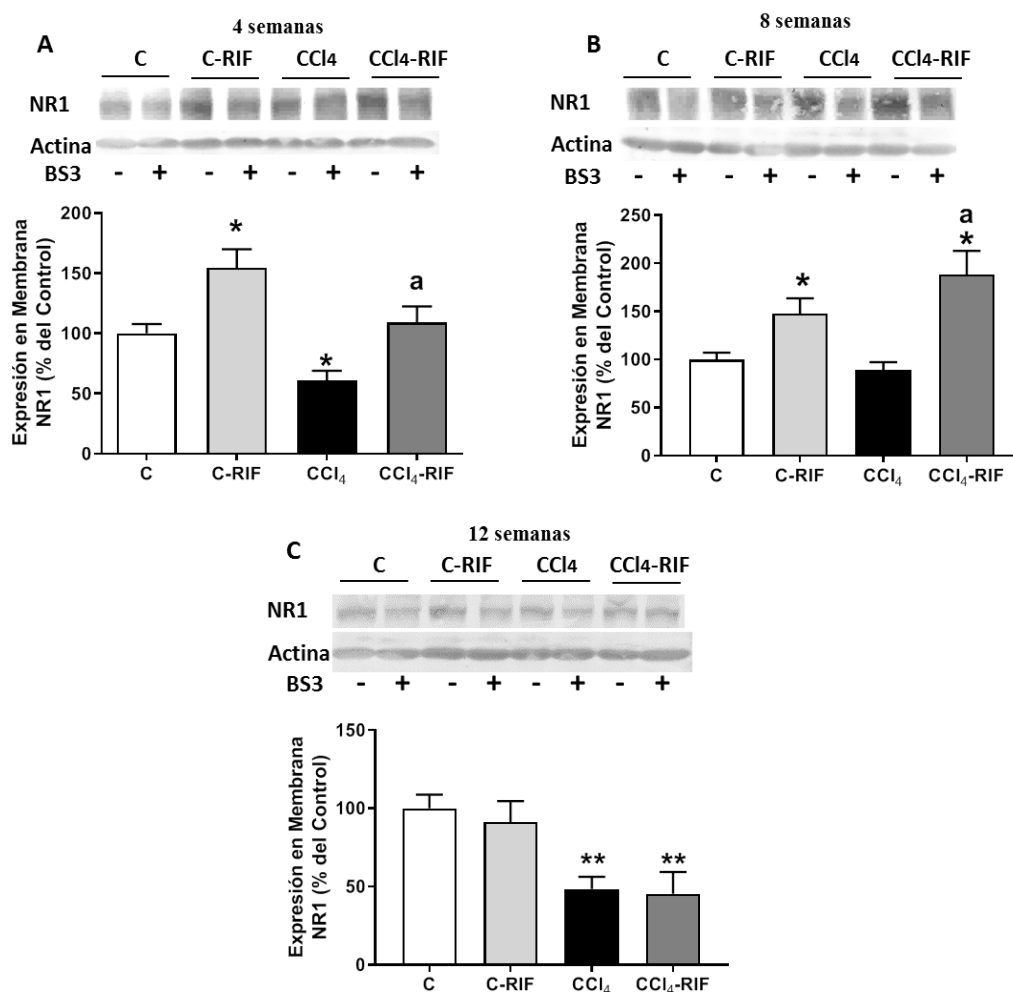


Figura 45. El fallo hepático induce una disminución de la expresión en membrana de NR1 en hipocampo, que se previene mediante el tratamiento con rifaximina en el estadio de esteatohepatitis pero no en el de cirrosis. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 (A), 8 (B) y 12 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la expresión en membrana de NR1 en hipocampo. Los valores son la media \pm SEM de 8-20 ratas por grupo. En A y C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En B los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y "a" respecto a las ratas con daño hepático inducido por CCl₄ "a" $p < 0.05$.

La expresión en membrana de la subunidad NR2A de los receptores NMDA disminuye en ratas con esteatohepatitis a las 4 semanas (61 ± 8.9 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 46A) y a las 8 semanas (75 ± 7.4 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 46B). En ratas con esteatohepatitis leve, el tratamiento con rifaximina aumenta significativamente la expresión en membrana de NR2A en ratas CCl₄ (92 ± 13.5 % de los controles, $p < 0.05$).

y 205 ± 18.5 % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 46A). A las 8 semanas se observa un aumento de la expresión en membrana de NR2A en los grupos tratados con rifaximina (155 ± 17.5 % de los controles, $p < 0.05$ y 205 ± 18.5 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura B), mientras que en ratas cirróticas no se observan diferencias significativas entre grupos (Figura 46C).

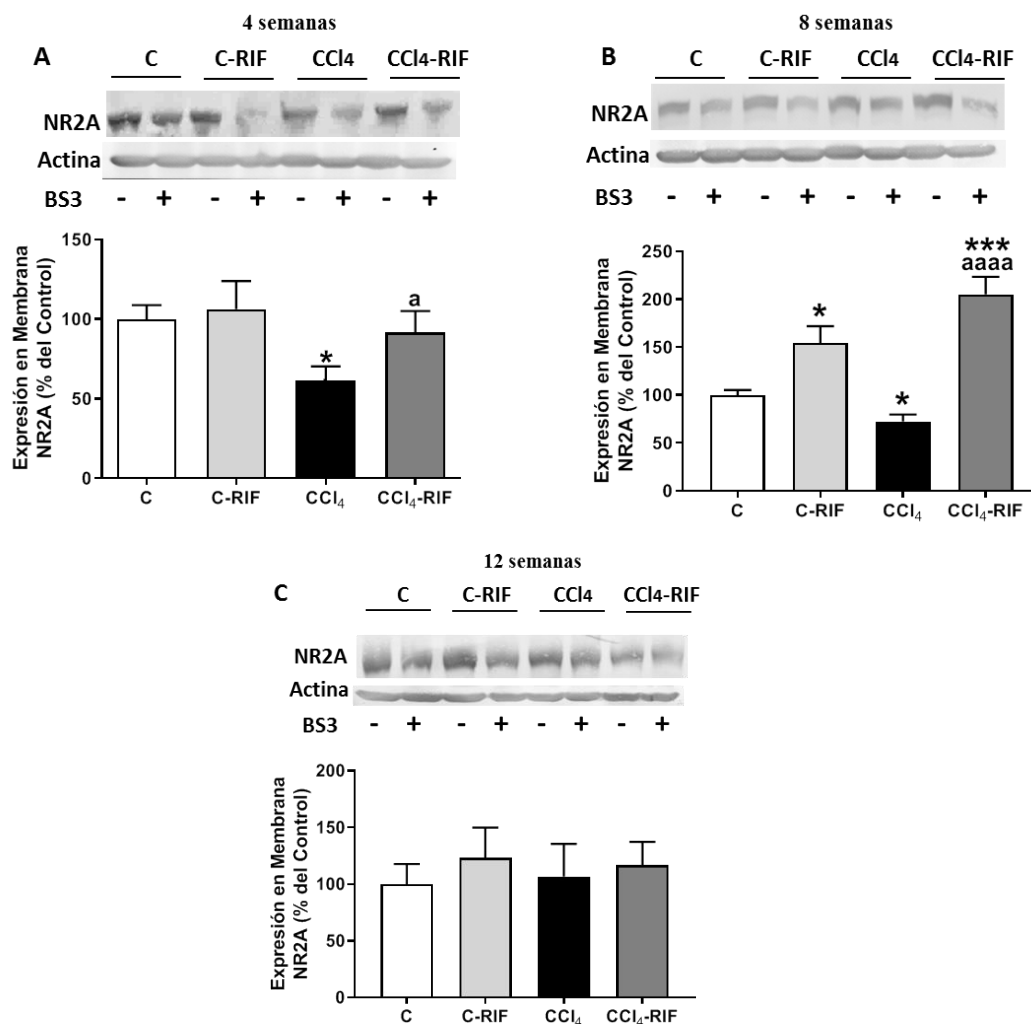


Figura 46. El fallo hepático induce una disminución de la expresión en membrana de NR2A en hipocampo de ratas con esteatohepatitis, que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 (A), 8 (B) y 12 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la expresión en membrana de NR2A en hipocampo. Los valores son la media \pm SEM de 8-20 ratas por grupo. En A y C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En B los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y "a" respecto a las ratas con daño hepático "a" $p < 0.05$, "aaaa" $p < 0.0001$.

La expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA no se ve alterada en ratas con esteatohepatitis leve (Figura 47A), esteatohepatitis avanzada (Figura 47B), o cirrosis (Figura 47C). A las 12 semanas se observa un aumento de le

expresión en membrana de NR2B en las ratas cirróticas tratadas con rifaximina comparado con las ratas CCl₄ (140 ± 17.9 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 47C).

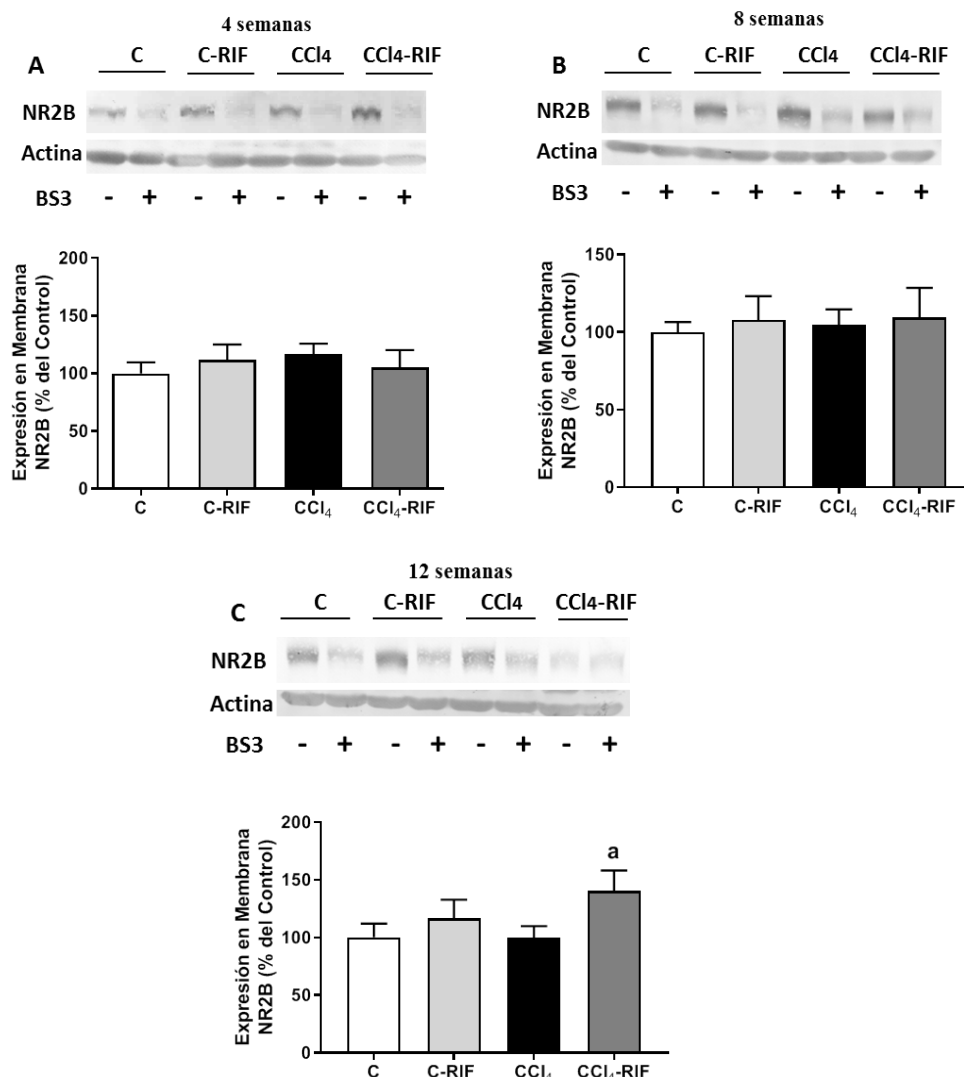


Figura 47. El fallo hepático no afecta la expresión en membrana de NR2B en hipocampo. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 (A), 8 (B) y 12 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la expresión en membrana de NR2B en hipocampo. Los valores son la media \pm SEM de 8-20 ratas por grupo. En A y C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En B los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. "a" indica diferencia significativa respecto a las ratas con cirrosis inducida por CCl₄ "a" $p < 0.05$.

La expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ de los receptores GABA no está alterada en ratas con esteatohepatitis, a las 4 semanas de administración de CCl₄ (Figura 48A) pero se observa una disminución significativa en ratas con esteatohepatitis avanzada (69 ± 5.7 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 48B) que se previene mediante el tratamiento con rifaximina (109 ± 10.2 % de los controles, $p < 0.05$). En ratas con cirrosis la expresión en membrana de GABA_A $\alpha 1$ está aumentada (157 ± 13.9 % de los controles,

$p < 0.05$) (Figura 48C) y el tratamiento con rifaximina no revierte esta alteración (146 ± 22.7 % de los controles, n.s.).

A las 4 semanas de administración de CCl_4 y 2 semanas de tratamiento con rifaximina, ésta induce un aumento significativo de la expresión en membrana de $\text{GABA}_A\alpha 1$ tanto en ratas control (171 ± 27.8 % de los controles, $p < 0.05$) como en ratas con esteatohepatitis (172 ± 23.7 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 48A).

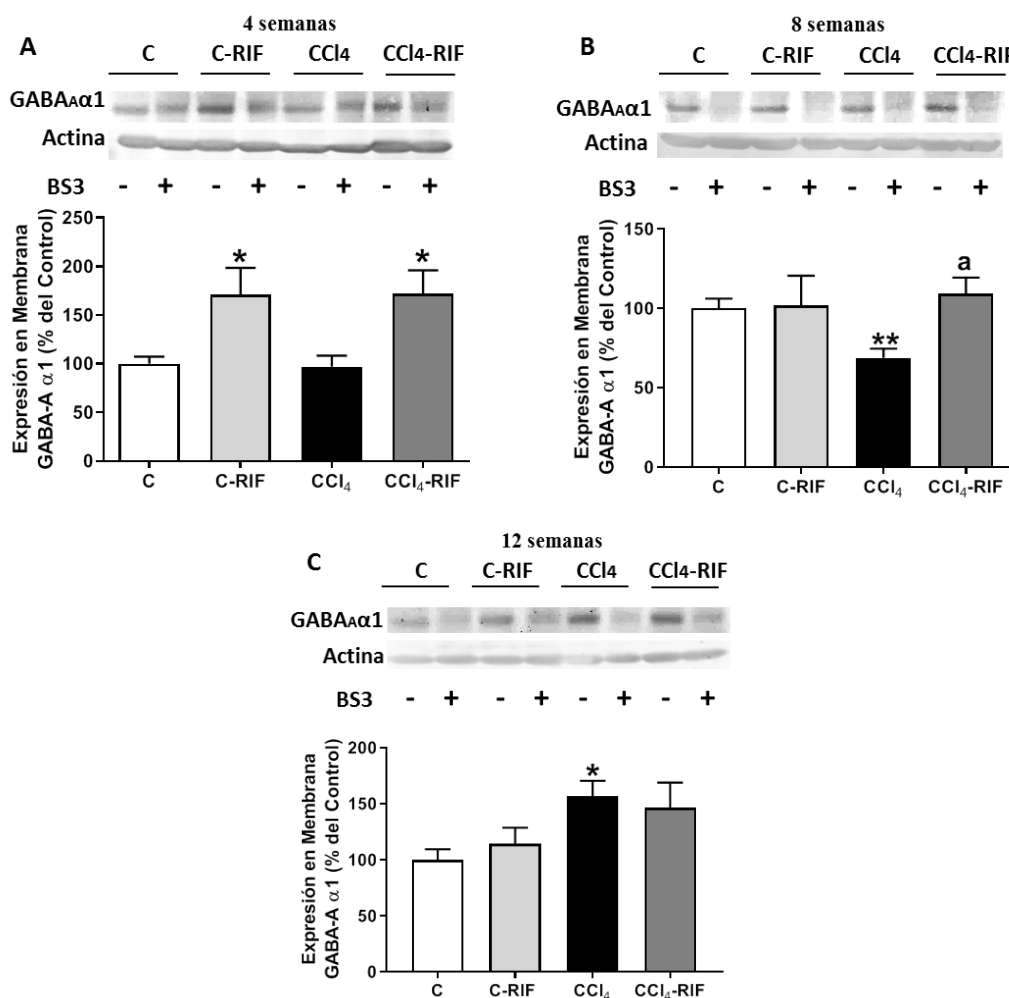


Figura 48. El fallo hepático induce alteración de la expresión en membrana de $\text{GABA}_A\alpha 1$ en hipocampo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina en el estadio de esteatohepatitis avanzada. Se analizó en ratas inyectadas con CCl_4 durante 4 (A), 8 (B) y 12 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la expresión en membrana de $\text{GABA}_A\alpha 1$ en hipocampo. Los valores son la media \pm SEM de 8-17 ratas por grupo. En A y B los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control ** $p < 0.01$, y "a" respecto a las ratas CCl_4 "a" $p < 0.05$.

La expresión en membrana de la subunidad $\text{GABA}_A\alpha 5$ de los receptores GABA no se ve alterada en ratas con esteatohepatitis a las 4 semanas (Figura 49A). Se observa una disminución de la expresión en membrana de $\text{GABA}_A\alpha 5$ en ratas con esteatohepatitis

avanzada (51 ± 9.3 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 49B) que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina (61 ± 10.8 % de los controles, ns). Esta alteración se mantiene en ratas cirróticas (58 ± 9.3 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 49C) y el tratamiento con rifaximina no la revierte (73 ± 8.5 % de los controles, n.s.). A 12 semanas de inyección de CCl_4 también se observa una disminución de la expresión en membrana de $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 5$ en ratas control tratadas con rifaximina (59 ± 9.1 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 49C).

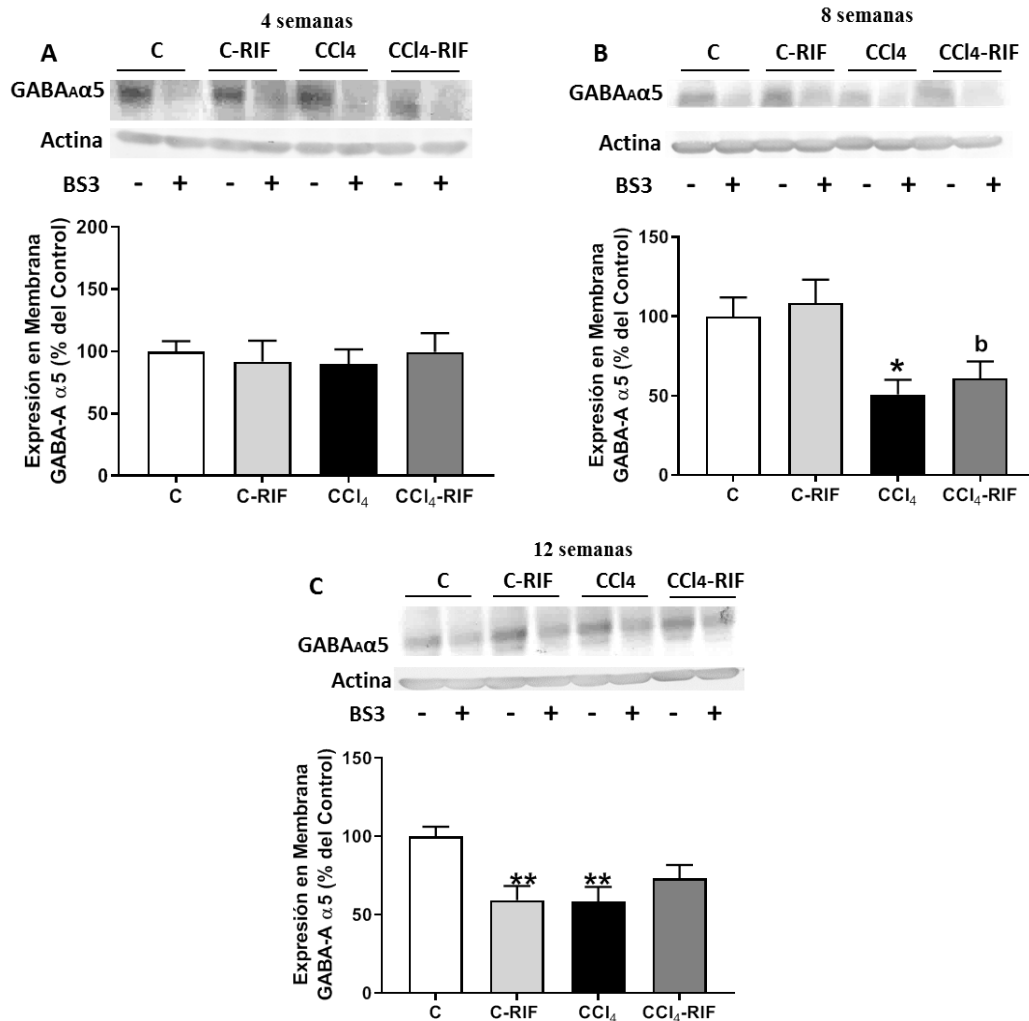


Figura 49. Las ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis presentan disminución de la expresión en membrana de $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 5$ en hipocampo que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl_4 durante 4 (A), 8 (B) y 12 (C) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo la expresión en membrana de $\text{GABA}_{\text{A}}\alpha 5$ en hipocampo. Los valores son la media \pm SEM de 7-16 ratas por grupo. En A los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En B y C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, y "b" respecto a las ratas control tratadas con rifaximina "b" $p < 0.05$.

9.2 El daño hepático induce neuroinflamación en el hipocampo.

Efectos de la rifaximina

Estudiamos si las alteraciones en la neurotransmisión en hipocampo están asociadas a neuroinflamación en esta área. Para ello analizamos la activación de microglía y astrocitos en el hipocampo de ratas con distintos grados de fallo hepático.

Las ratas con daño hepático muestran activación de la microglía en hipocampo, tal como revela la morfología de la microglía teñida con anti-IBA-1 y la medida del perímetro, a 2 (358 ± 11.1 frente a $519 \pm 21.4 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 50 A y E), 4 (386 ± 10.7 frente a $504 \pm 17.3 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 50 B y F), 8 (380 ± 16.2 frente a $454 \pm 13.3 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) (Figura 50 C y G) y 12 (329 ± 13.5 frente a $464 \pm 15.8 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 50 D y H) semanas de administración de CCl_4 , es decir, durante todos los estadios de daño hepático. El tratamiento con rifaximina revierte la activación de la microglía a 2 ($528 \pm 24.7 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Figura 50 A y E), 4 ($469 \pm 15.5 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) (Figura 50 B y F), 8 ($462 \pm 17.9 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) (Figura 50 C y G) y 12 semanas ($387 \pm 14.7 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (Figura D y H). También se observa a 4 semanas activación de microglía en ratas control tratadas con rifaximina ($428 \pm 14.2 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) (Figura 50 B y F). A 12 semanas la rifaximina tiene un efecto parcial en las ratas cirróticas, ya que la microglía está activada respecto a las ratas control ($487 \pm 22.9 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) (Figura 50 D y H).

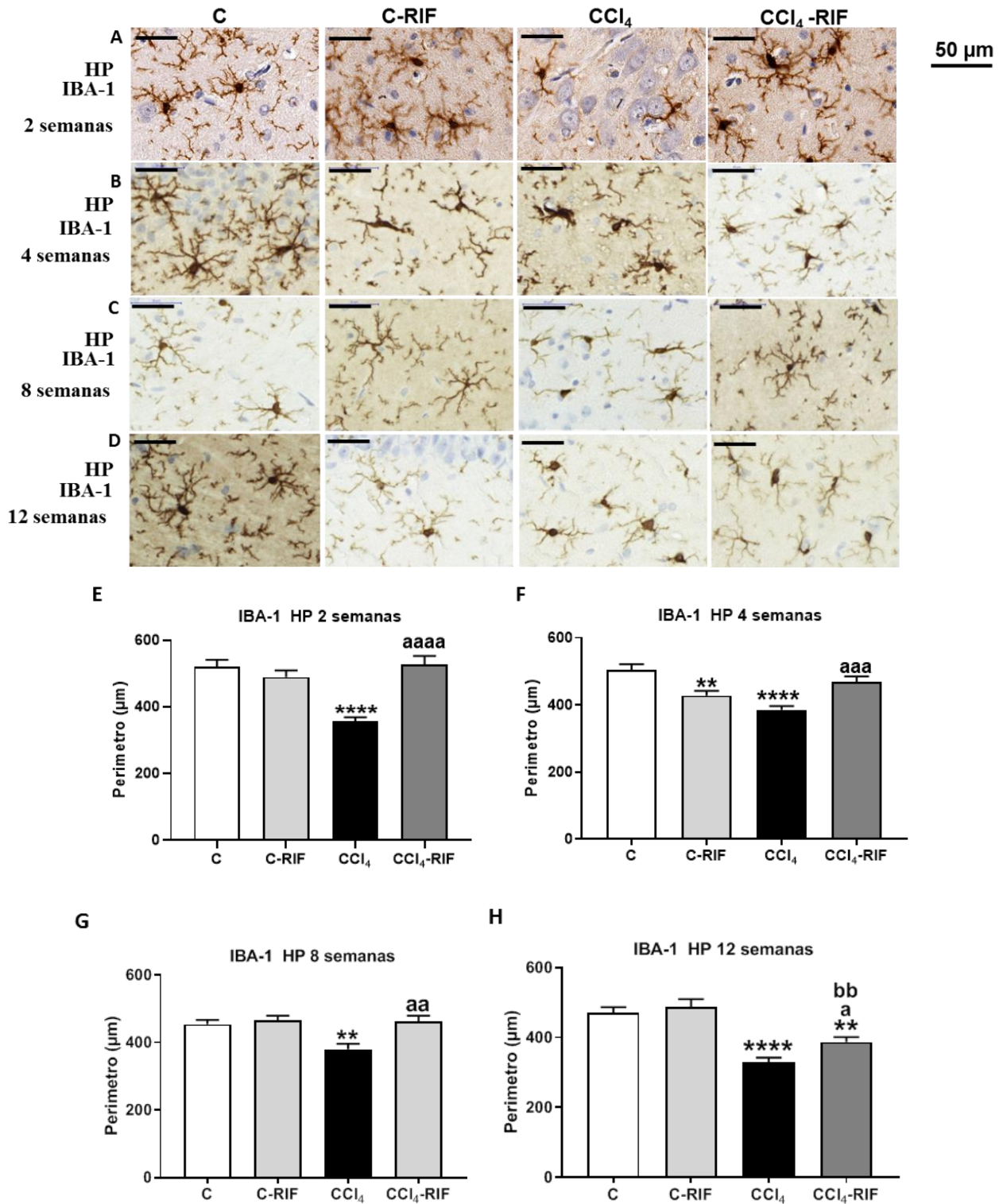


Figura 50. Las ratas con daño hepático presentan activación de la microglía en hipocampo que se previene con el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el perímetro de la microglía teñida por inmunohistoquímica con anti-IBA-1. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En E y F los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. En G y H los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, "a" respecto a las ratas CCl₄ "a" $p < 0.05$, "aa" $p < 0.01$, "aaa" $p < 0.001$, "aaaa" $p < 0.0001$ y "b" respecto al grupo control tratado con rifaximina "bb" $p < 0.01$.

Las ratas con daño hepático muestran activación de astrocitos en hipocampo, tal como revela el porcentaje de área teñida por inmunohistoquímica con anti-GFAP, a 4 (110 ± 1.75 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 51 B y F), 8 (121 ± 1.75 % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 51 C y G) y 12 (107 ± 2.04 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 51 D y H) semanas de inyección de CCl_4 , a partir del estadio de esteatohepatitis, pero no a 2 semanas, cuando presentan esteatohepatitis leve (Figura 51 A y E). El tratamiento con rifaximina revierte la activación de astrocitos a 8 (114 ± 2.56 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 51 C y G) y 12 semanas (82 ± 1.72 % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 51 D y H), en ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis hepática pero no a 4 semanas (Figura 51 B y F). A 2 semanas la rifaximina induce un aumento del contenido de GFAP en ratas con esteatohepatitis leve comparado con ratas CCl_4 (107 ± 2.35 frente a 96 ± 2.32 % de los controles, $p < 0.05$) y control tratadas con rifaximina (107 ± 2.35 frente a 93 ± 2.55 % de los controles, $p < 0.001$) (Figura 51 A y E). También se observa en las ratas control tratadas con rifaximina un mayor porcentaje de área teñida por GFAP a 8 semanas (124 ± 3.02 % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 51 C y G) y un menor porcentaje a 12 semanas (91 ± 1.94 % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 51 D y H). Además, el tratamiento con rifaximina en ratas con daño hepático reduce significativamente la activación de los astrocitos comparado con las ratas control tratadas con rifaximina a 8 ($p < 0.05$) (Figura 51 C y G) y 12 semanas ($p < 0.01$) (Figura 51 D y H).

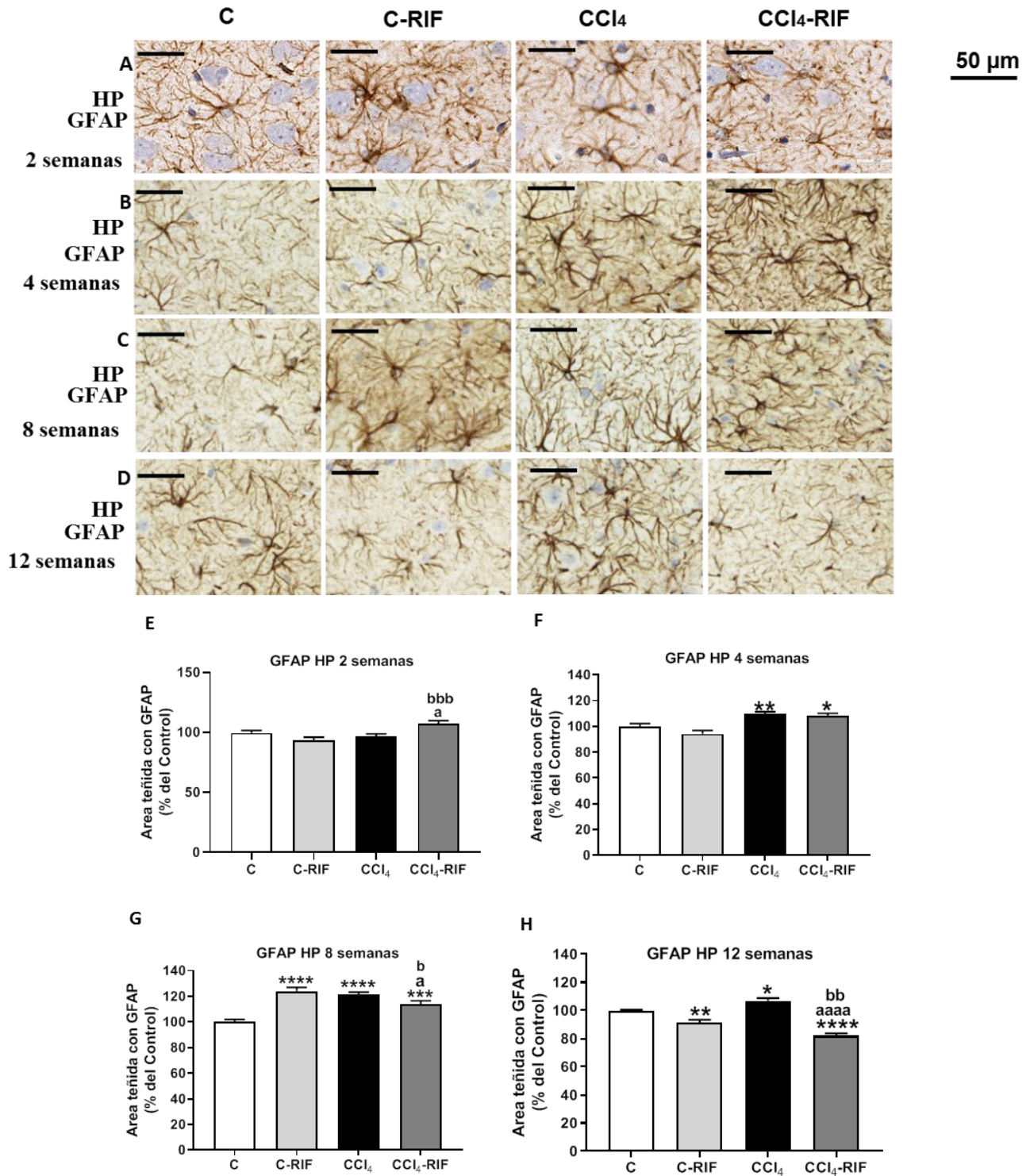


Figura 51. Las ratas con daño hepático presentan activación de astrocitos en hipocampo que se previene con el tratamiento con rifaximina en ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el porcentaje de área teñida por inmunohistoquímica con anti-GFAP. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En E y G los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En F los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En H los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * p <0.05, ** p <0.01, **** p <0.0001, "a" respecto a las ratas CCl₄ "a" p <0.05, "aaaa" p <0.0001 y "b" respecto al grupo control tratado con rifaximina "b" p <0.05, "bb" p <0.01, "bbb" p <0.001.

9.3 Las ratas con esteatohepatitis leve tienen disminuidos los niveles de IL-1 β en CA1, pero el contenido de IL-1 β aumenta en ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis. El tratamiento con rifaximina revierte este aumento

Evaluamos las citoquinas pro-inflamatorias involucradas en el proceso de neuroinflamación. Analizamos por inmunohistoquímica el contenido de IL-1 β en hipocampo.

Los niveles de IL-1 β disminuyen en la región CA1 del hipocampo de ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 semanas (60 ± 5.05 u.a % de los controles, $p < 0.0001$) (Figura 52 A y E). Estos niveles aumentan tras 4 (120 ± 4.10 u.a % de los controles, $p < 0.001$) (Figura 52 B y F), 8 (111 ± 2.26 u.a % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 52 C y G) y 12 semanas (138 ± 6.83 u.a % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 52 D y H). El tratamiento con rifaximina aumenta los niveles de IL-1 β en ratas con esteatohepatitis leve (79 ± 4.47 u.a. % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 52 A y E), pero no llega a prevenir esta alteración, ya que el contenido de IL-1 β sigue siendo significativamente inferior que en la ratas control ($p < 0.01$). La rifaximina revierte el aumento de IL-1 β a las semanas 8 (100 ± 2.42 u.a. % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 52 C y G) y 12 (108 ± 8.82 u.a. % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 52 D y H), cuando las ratas presentan respetivamente esteatohepatitis avanzada y cirrosis, pero no a 4 semanas (Figura 52 B y F). A la semana 4 también se observa un aumento de los niveles de IL-1 β en el grupo control tratado con rifaximina (115 ± 2.70 u.a. % de los controles, $p < 0.01$) (Figura 52 B y F).

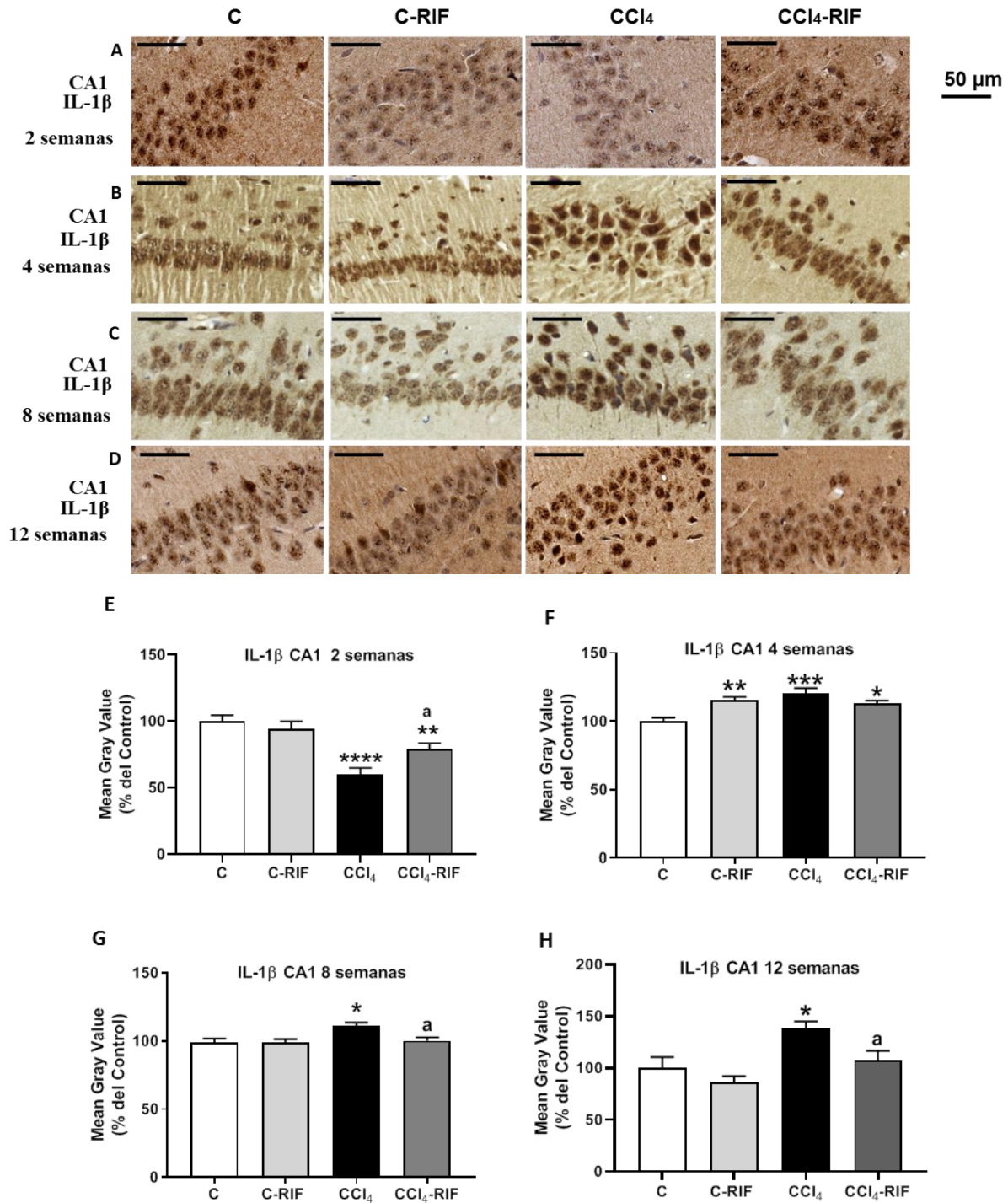


Figura 52. Las ratas con daño hepático tienen alterados los niveles de IL-1 β en CA1. La rifaximina normaliza estos niveles en ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de IL-1 β por inmunohistoquímica. La cuantificación se expresa según la media en la escala de grises (Mean Gray Value). Los valores son la media \pm SEM de 3-6 ratas por grupo. En E, F y H los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En G los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” p <0.05.

9.4 Las ratas con daño hepático tienen aumentados los niveles de TNF α en CA1. El tratamiento con rifaximina revierte este aumento en ratas con esteatohepatitis pero no en ratas cirróticas

Analizamos por inmunohistoquímica el contenido de TNF α en CA1.

Tras 2 semanas de inyección de CCl₄ no se observan diferencias entre los grupos (Figura 53 A y E), mientras que los niveles de TNF α aparecen aumentados en la región CA1 del hipocampo de ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 (22 ± 1.05 u.a. comparado con 19 ± 1.28 u.a., $p < 0.05$) (Figura 53 B y F), 8 (17 ± 0.61 u.a. comparado con 13 ± 0.54 u.a., $p < 0.0001$) (Figura 53 C y G) y 12 semanas (13 ± 0.29 comparado con 11 ± 0.38 u.a., $p < 0.001$) (Figura 53 D y H). El tratamiento con rifaximina revierte esta alteración a las semanas 4 (17 ± 1.62 u.a., $p < 0.01$) (Figura 53 B y F) y 8 (13 ± 0.61 u.a., $p < 0.0001$) (Figura 53 C y G), pero no a 12, en ratas con cirrosis (13 ± 0.40 u.a., $p < 0.001$) (Figura 53 D y H). A 12 semanas también se observa aumento del contenido de TNF α en ratas control tratadas con rifaximina (13 ± 0.34 u.a., $p < 0.01$) (Figura 53 D y H).

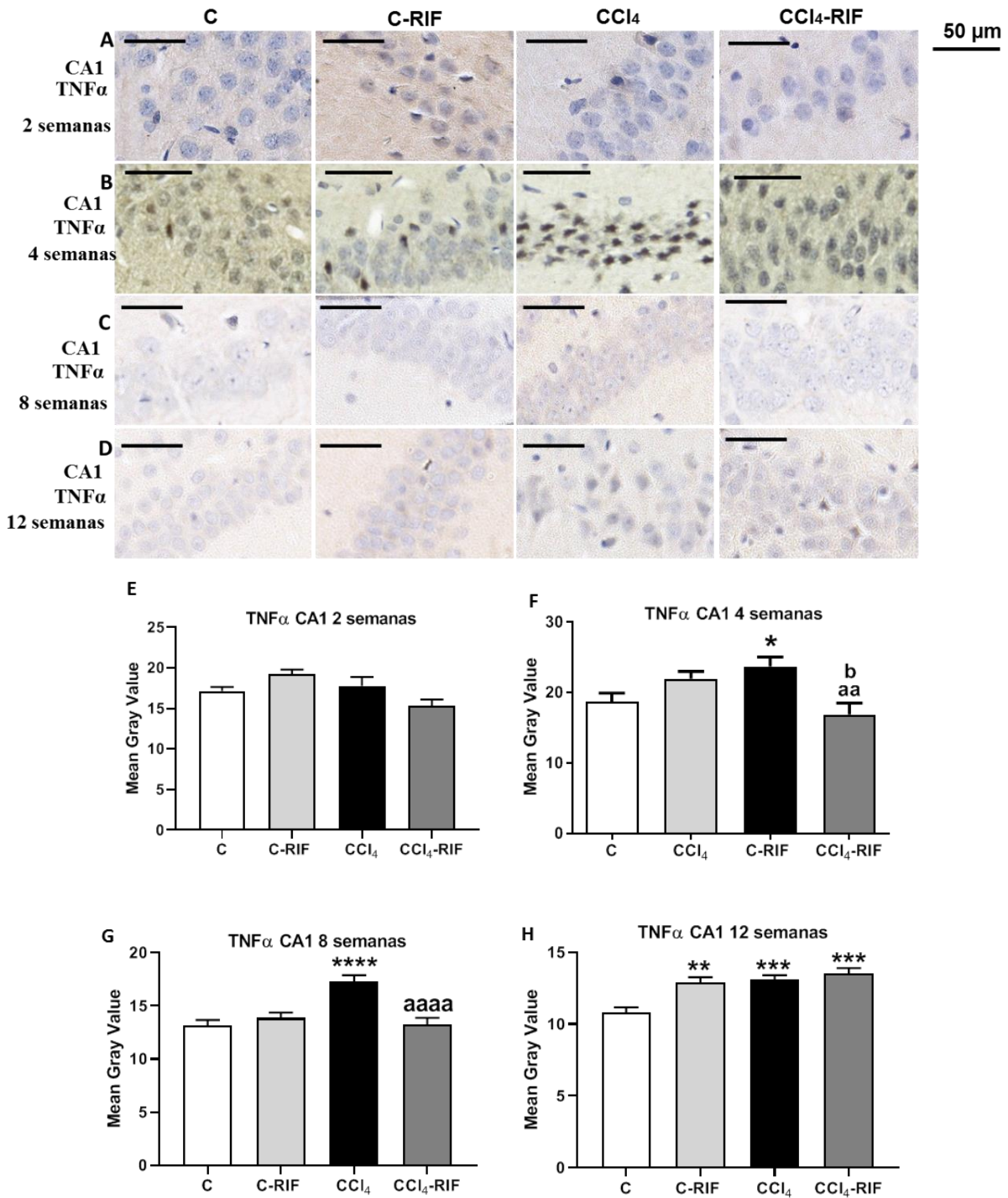


Figura 53. Las ratas con daño hepático presentan aumento de los niveles de TNF α en CA1 que se revierte con el tratamiento con rifaximina en ratas con esteatohepatitis, pero no en ratas cirróticas. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, E), 4 (B, F), 8 (C, G) y 12 (D, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de TNF α por inmunohistoquímica. Los valores son la media \pm SEM de 3-6 ratas por grupo. En E, F y G los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En H los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, “a” respecto a las ratas CCl₄ “aa” p <0.01, “aaaa” p <0.0001 y “b” respecto al grupo control tratado con rifaximina “b” p <0.05

10. La inducción del daño hepático se asocia con un rápido aumento de la inflamación periférica

La neuroinflamación en hipocampo y cerebelo inducida por el daño hepático por administración crónica de CCl₄ puede ser debida a la transducción al cerebro de la inflamación periférica. Para estudiar esta hipótesis analizamos en primer lugar si el daño hepático induce inflamación periférica. Para ello medimos los niveles plasmáticos de varias citocinas.

Tras 1 semana de administración de CCl₄ ya hay un aumento significativo en los niveles plasmáticos de las citocinas proinflamatorias TNF α , IL-6, IL-15 e IFN- γ y de las quimiocinas CX3CL1 y CCL5 (Tabla 11A).

Tras 2 semanas de administración de CCl₄ la IL-6, el IFN γ y CCL5 ya no están aumentados comparado con las ratas control. Sin embargo, están aumentados los niveles plasmáticos de las citocinas proinflamatorias IL-15, IL-17 y TNF α y de las quimiocinas CX3CL1 y CCL20 (Tabla 11A). El tratamiento con rifaximina durante solo una semana previene el incremento de los niveles plasmáticos de IL-15, TNF α , y CCL20, pero no de IL-17 y CX3CL1 (Tabla 11B). La rifaximina aumenta significativamente los niveles de CCL20 en las ratas control (Tabla 11B).

Tras 4 semanas de administración de CCl₄ se observa un cambio importante en la inflamación periférica. El TNF α y CX3CL1 permanecen significativamente aumentados. Las interleucinas proinflamatorias IL-17, IL-15 y la quimiocina CCL20 vuelven a valores normales, mientras que hay un aumento de las citocinas antiinflamatorias IL-4 y TGF β y una disminución de la IL-10 (tabla 11A). El tratamiento con rifaximina previene el aumento de IL-4, TGF β , TNF α y CX3CL1, pero no previene la disminución de IL-10 (tabla 11B).

Tras 8 semanas de inyección de CCl₄ los niveles de TNF α , IL-4, TGF β e IL-10 vuelven a valores normales (tabla 11A), mientras que se verifica un aumento de IL-15, CCL20 y CX3CL1 (tabla 11A), que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina (tabla 11B).

Tras 12 semanas de inyección de CCl₄ los niveles de CX3CL1 vuelven a valores normales, mientras que los de CCL20 siguen estando aumentados (tabla 11A). Además, se observa un aumento de los niveles plasmáticos de TNF α , IFN γ , TGF β , IL-17 e IL-18

y una disminución de los niveles de IL-10 (tabla 11A). El tratamiento con rifaximina restaura los niveles de IFN γ , TGF β , IL-17, IL-18 y IL-10 pero no los de TNF α y CCL20 (tabla 11B).

Tabla 11. Alteraciones de citocinas en plasma de ratas CCl₄ tras diferentes tiempos de administración de CCl₄. Efectos de la rifaximina

A.

	1 semana	2 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas
Citocinas	Media \pm SEM (% del control)	Media \pm SEM (% del control)	Media \pm SEM (% del control)	Media \pm SEM (% del control)	Media \pm SEM (% del control)
TNF α	295 \pm 80* (n=12)	348 \pm 77* (n=5)	266 \pm 51** (n=8)	122 \pm 9 (n=5)	258 \pm 44* (n=10)
INF γ	123 \pm 6* (n=15)	103 \pm 8 (n=15)	111 \pm 8 (n=10)	104 \pm 10 (n=10)	151 \pm 9* (n=9)
IL-6	120 \pm 6* (n=9)	110 \pm 9 (n=12)	98 \pm 8 (n=16)	94 \pm 7 (n=18)	100 \pm 9 (n=12)
IL-15	148 \pm 18* (n=12)	141 \pm 9*** (n=20)	104 \pm 7 (n=11)	167 \pm 18* (n=11)	102 \pm 12 (n=13)
IL-17	108 \pm 13 (n=9)	139 \pm 8* (n=16)	105 \pm 9 (n=16)	87 \pm 9 (n=19)	155 \pm 16** (n=11)
IL-18	80 \pm 5 (n=10)	110 \pm 6 (n=7)	85 \pm 12 (n=9)	113 \pm 17 (n=7)	161 \pm 23* (n=9)
IL-10	108 \pm 9 (n=9)	114 \pm 8 (n=19)	62 \pm 9** (n=15)	100 \pm 10 (n=20)	43 \pm 7** (n=8)
TGF β	108 \pm 6 (n=15)	94 \pm 4 (n=22)	129 \pm 10* (n=14)	112 \pm 6 (n=12)	131 \pm 7* (n=13)
IL-4	105 \pm 4 (n=12)	100 \pm 5 (n=14)	139 \pm 8*** (n=15)	95 \pm 7 (n=14)	118 \pm 11 (n=13)
CX3CL1	145 \pm 14* (n=16)	146 \pm 15* (n=8)	158 \pm 16** (n=10)	63 \pm 5 * (n=7)	98 \pm 7 (n=8)
CCL5	198 \pm 32* (n=15)	110 \pm 8 (n=18)	112 \pm 8 (n=8)	105 \pm 8 (n=19)	105 \pm 12 (n=9)
CCL20	100 \pm 12 (n=7)	156 \pm 17** (n=18)	89 \pm 13 (n=12)	147 \pm 15* (n=9)	176 \pm 26 * (n=10)
CCL2	106 \pm 13 (n=8)	95 \pm 12 (n=11)	101 \pm 6 (n=8)	97 \pm 8 (n=9)	104 \pm 14 (n=12)

Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

B.

Citocinas	2 semanas Media \pm SEM (% del control)			Citocinas	4 semanas Media \pm SEM (% del control)		
	C-RIF	CCl ₄	CCl ₄ -RIF		C-RIF	CCl ₄	CCl ₄ -RIF
TNF α	52 \pm 22 (n=4)	348 \pm 77* (n=5)	115 \pm 83a (n=3)	TNF α	119 \pm 29 (n=10)	266 \pm 51* (n=8)	138 \pm 42 (n=6)
IL-15	98 \pm 10 (n=10)	147 \pm 15* (n=9)	104 \pm 9a (n=9)	IL-4	116 \pm 8 (n=15)	139 \pm 8** (n=15)	107 \pm 9a (n=14)
IL-17	118 \pm 13 (n=6)	143 \pm 12* (n=8)	139 \pm 8* (n=8)	IL-10	91 \pm 8 (n=15)	62 \pm 9** (n=15)	61 \pm 8** (n=13)
CX3CL1	119 \pm 12 (n=6)	146 \pm 15* (n=8)	157 \pm 17* (n=7)	TGF β	135 \pm 10* (n=13)	141 \pm 14* (n=14)	97 \pm 9a (n=10)
CCL20	197 \pm 22* (n=7)	235 \pm 31* (n=5)	97 \pm 16a,b (n=6)	CX3CL1	81 \pm 13 (n=9)	158 \pm 16** (n=10)	86 \pm 20a (n=6)

Citocinas	8 semanas Media \pm SEM (% del control)			Citocinas	12 semanas Media \pm SEM (% del control)		
	C-RIF	CCl ₄	CCl ₄ -RIF		C-RIF	CCl ₄	CCl ₄ -RIF
TNF α	121 \pm 15 (n=5)	122 \pm 9 (n=5)	119 \pm 8 (n=6)	TNF α	158 \pm 27 (n=7)	258 \pm 44* (n=10)	263 \pm 26** (n=12)
IL-15	100 \pm 18 (n=12)	167 \pm 18* (n=11)	190 \pm 27** (n=12)	IL-17	105 \pm 11 (n=12)	155 \pm 16** (n=11)	109 \pm 8a (n=12)
CCL20	107 \pm 16 (n=5)	147 \pm 15* (n=9)	150 \pm 13* (n=9)	IL-18	95 \pm 12 (n=8)	161 \pm 23* (n=9)	98 \pm 13a (n=9)
CX3CL1	82 \pm 10 (n=7)	63 \pm 5* (n=7)	58 \pm 8* (n=6)	IFN γ	123 \pm 13 (n=10)	151 \pm 9** (n=9)	100 \pm 11aa (n=10)
				IL-10	95 \pm 15 (n=9)	43 \pm 7** (n=8)	97 \pm 13aa (n=8)
				TGF β	106 \pm 6 (n=17)	131 \pm 7* (n=13)	103 \pm 9a (n=16)
				CCL20	168 \pm 20 (n=8)	176 \pm 26* (n=10)	150 \pm 15 (n=9)

Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” p<0.05, “aa” p<0.01.

11. Estudio de poblaciones leucocitarias en sangre total mediante citometría de flujo

Analizamos si la inflamación periférica está asociada a alteraciones en el inmunofenotipo. Para ello analizamos distintas poblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo en sangre total de ratas con distintos grados de fallo hepático.

11.1 Caracterización del inmunofenotipo en ratas con esteatohepatitis leve

11.1.1 Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T *helper* y un aumento de los linfocitos T citotóxicos

Tras 2 semanas de administración de CCl₄ el porcentaje de linfocitos totales CD3⁺ no se ve afectado (Figura 54A), mientras que se observa una disminución significativa de los linfocitos T *helper* CD4⁺ ($66.11 \pm 0.63\%$ frente a $70.4 \pm 0.58\%$, $p < 0.0001$) (Figura 54B) y un aumento en los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (30.54 ± 0.81 frente a $26.88 \pm 0.70\%$, $p < 0.001$) (Figura 54C).

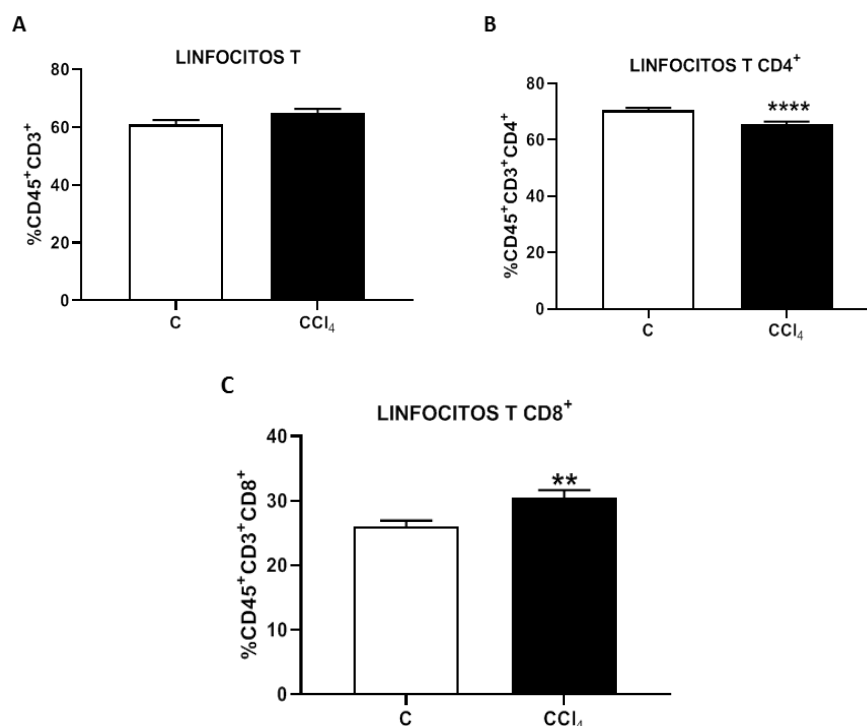


Figura 54. En ratas con esteatohepatitis leve disminuyen los linfocitos T *helper* y aumentan los linfocitos T citotóxicos. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 semanas el contenido en sangre periférica de linfocitos totales marcados con CD3 (A), linfocitos T *helper* con CD4 (B) y linfocitos T citotóxicos con CD8 (C). Los valores son la media \pm SEM de 14-18 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un t-test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

11.1.2 Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T de memoria

En rata los linfocitos de memoria se caracterizaron por tener una alta expresión del marcador de superficie CD44 y baja expresión de CD62L.

Tras 2 semanas de administración de CCl₄ se observa una disminución del porcentaje de los linfocitos T de memoria, tanto CD4⁺ (7.72 ± 0.63 % frente a 16.10 ± 1.09 %, $p < 0.0001$) (Figura 55A) como CD8⁺ (15.05 ± 1.73 % frente a 21.81 ± 2.56 %, $p < 0.05$) (Figura 55C). Consecuentemente en las ratas CCl₄ se observa un aumento del porcentaje de los linfocitos T *naïve*, tanto CD4⁺ (80.88 ± 1.51 % frente a 73.91 ± 1.45 %, $p < 0.01$) (Figura 55B) como CD8⁺ (76.89 ± 2.11 % frente a 68.55 ± 2.94 %, $p < 0.05$) (Figura 55D).

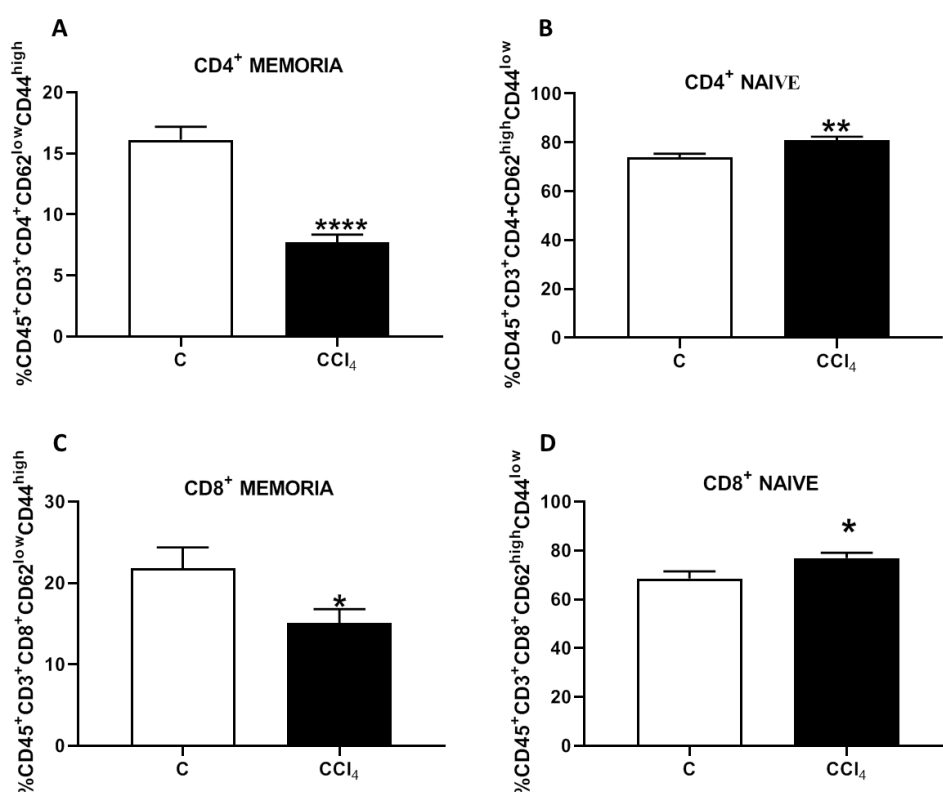


Figura 55. Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T de memoria. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 semanas el contenido en sangre periférica de linfocitos T de memoria (que se identifican por una alta expresión del CD44 y una baja expresión del CD62L) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (C), y de los linfocitos T *naïve* (que tienen alta expresión del CD62L y baja expresión de CD44) CD4⁺ (B) y CD8⁺ (D). Los valores son la media \pm SEM de 7-9 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un t-test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

11.1.3 Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T reguladores CD8⁺

Los linfocitos T reguladores se identificaron mediante la expresión del marcador de superficie CD25 y la expresión intracelular del factor de transcripción FOXP3.

Tras 2 semanas de administración de CCl₄ se observa una disminución de los linfocitos T reguladores CD8⁺ (0.33 ± 0.02 % frente a 0.55 ± 0.04 %, $p < 0.001$) (Figura 56B) pero no de los CD4⁺ (Figura 56A).

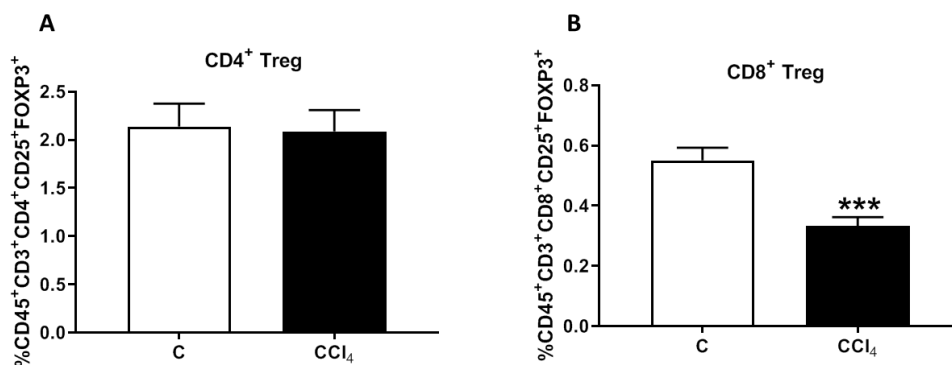


Figura 56. Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos T reguladores CD8⁺. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 semanas el contenido en sangre periférica de linfocitos T reguladores (marcados con CD25 y FoxP3) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B). Los valores son la media \pm SEM de 14-17 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un t-test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *** $p < 0.0005$.

11.1.4 Las ratas con esteatohepatitis leve muestran un aumento de los linfocitos T autoreactivos CD4⁺

Los linfocitos autorreactivos son negativos para el marcador de superficie y molécula coestimuladora CD28.

Tras 2 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento de los linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (0.58 ± 0.06 % frente a 0.36 ± 0.06 %, $p < 0.05$) (Figura 57A) pero no de los CD8⁺ (Figura 57B).

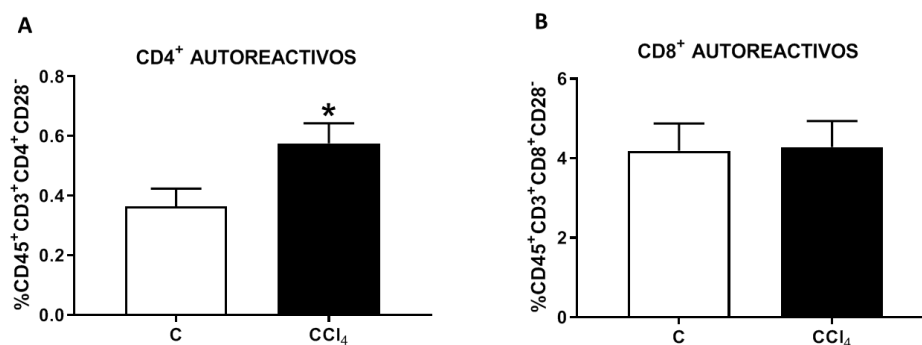


Figura 57. Las ratas con esteatohepatitis leve muestran un aumento de los linfocitos T autorreactivos CD4⁺. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 semanas el contenido en sangre periférica de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) (negativos para CD28). Los valores son la media \pm SEM de 7-9 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un t-test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05.

11.1.5 Las ratas con esteatohepatitis leve muestran una disminución de los linfocitos B

Tras 2 semanas de administración de CCl₄ se observa una disminución de los linfocitos B (21.5 ± 1.55 % frente a 27.23 ± 1.93 %, p<0.05) (Figura 58).

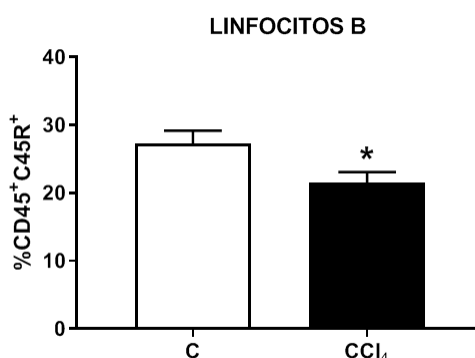


Figura 58. Las ratas con esteatohepatitis leve tienen disminuido el porcentaje de linfocitos B. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 semanas el contenido en sangre periférica de linfocitos B, positivos para el marcador CD45R. Los valores son la media \pm SEM de 14-16 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un t-test de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05.

11.1.6 Las ratas con esteatohepatitis leve no presentan activación de monocitos

Los monocitos se identifican mediante la expresión del marcador de superficie CD11b. La activación de monocitos se analizó mediante la co-expresión del marcador CD80. Tras 2 semanas de administración de CCl₄ no se observa activación de monocitos (Figura 59).

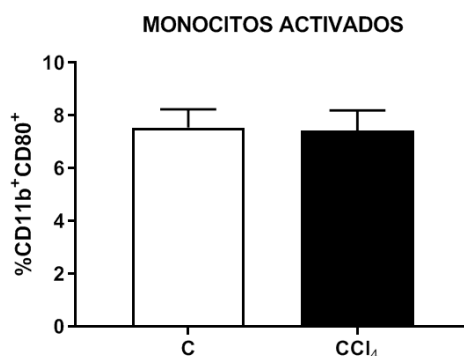


Figura 59. Las ratas con esteatohepatitis leve no muestran activación de los monocitos. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 semanas el contenido en sangre periférica de monocitos activados, positivos para CD11b y CD80. Los valores son la media \pm SEM de 17-18 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un t-test de Student.

11.2 Caracterización del inmunofenotipo en ratas con esteatohepatitis

En ratas con esteatohepatitis los porcentajes de linfocitos T *helper* o citotóxicos no están alterados, comparado con las ratas controles. La rifaximina tampoco altera estos porcentajes.

11.2.1 En ratas con esteatohepatitis están aumentados los linfocitos T de memoria

Tras 4 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento del porcentaje de los linfocitos T de memoria, tanto CD4⁺ (16 ± 1.7 % frente a 9.8 ± 0.56 %, $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figura 60A) como CD8⁺ (21.45 ± 2.28 % frente a 13.46 ± 1.37 %, $p < 0.01$) (Figura 60C). El tratamiento con rifaximina previene significativamente el aumento de los linfocitos T de memoria CD4⁺ (11 ± 0.70 %, $p < 0.05$) y CD8⁺ (14.28 ± 0.92 %, $p < 0.01$). En las ratas CCl₄ se observa una disminución del porcentaje de los linfocitos T *naïve*, tanto CD4⁺ (69.97 ± 2.8 % frente a 79.63 ± 1.86 %, $p < 0.01$) (Figura 60B) como CD8⁺ (72.62 ± 1.89 % frente a 82.53 ± 1.91 %, $p < 0.05$) (Figura 60D). El tratamiento con rifaximina previene la disminución de los linfocitos T *naïve* CD4⁺ (77.49 ± 1.53 %, $p < 0.05$) y CD8⁺ (81.51 ± 1.69 %, $p < 0.05$).

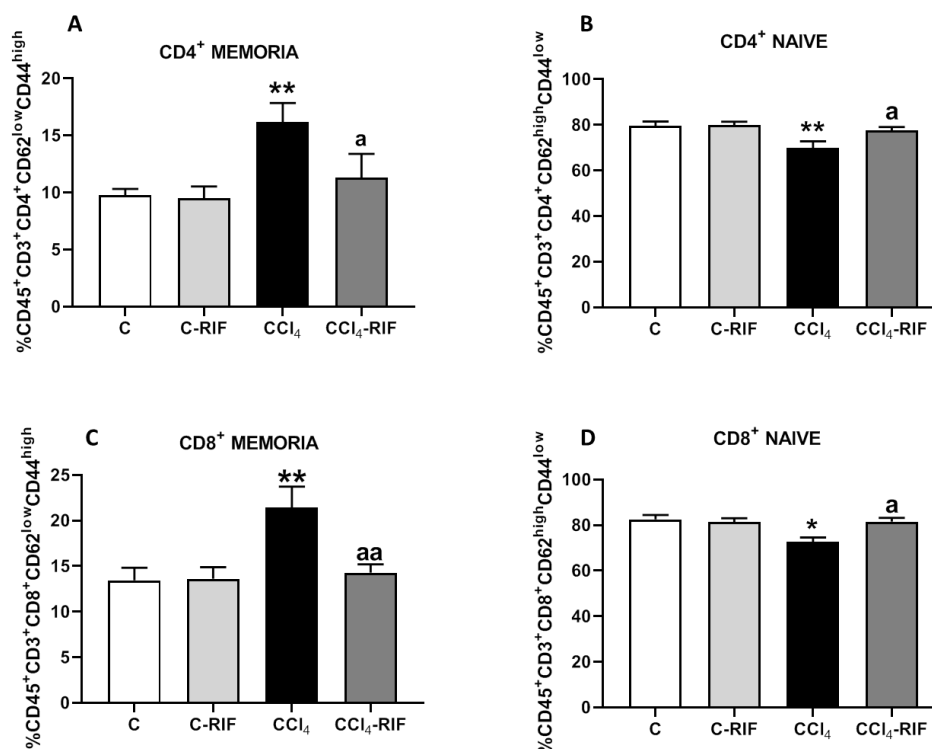


Figura 60. Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento de los linfocitos T de memoria que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T de memoria (que se identifican por una alta expresión del CD44 y una baja expresión del CD62L) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (C), y de los linfocitos T *naïve* (que tienen alta expresión del CD62L y baja expresión de CD44) CD4⁺ (B) y CD8⁺ (D). Los valores son la media \pm SEM de 7-10 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05, **p<0.01, “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis “a” p<0.05, “aa” p<0.01.

11.2.2 Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento de linfocitos T reguladores

Tras 4 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento de linfocitos T reguladores tanto CD4⁺ (3.45 ± 0.30 % frente a 2.30 ± 0.011 %, p<0.05) (Figura 61A) como CD8⁺ (0.74 ± 0.09 % frente a 0.36 ± 0.09 %, p<0.05) (Figura 61B). El tratamiento con rifaximina previene el aumento de linfocitos T reguladores CD4⁺ (2.17 ± 0.22 %, p<0.01) (Figura 61A) y CD8⁺ (0.40 ± 0.06 %, p<0.05) (Figura 61B).

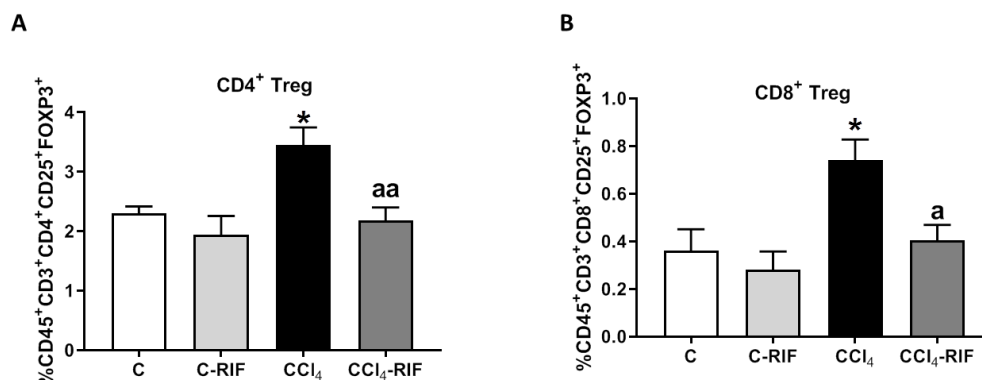


Figura 61. Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento de linfocitos T reguladores que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T reguladores (marcados con CD25 y FoxP3) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B). Los valores son la media \pm SEM de 4-5 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05, “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis “a” p<0.05, “aa” p<0.01.

11.2.3 Las ratas con esteatohepatitis no muestran cambios en los niveles de linfocitos T autorreactivos

Tras 4 semanas de administración de CCl₄ no se observa variación en el porcentaje de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (Figura 62A) o CD8⁺ (Figura 62B).

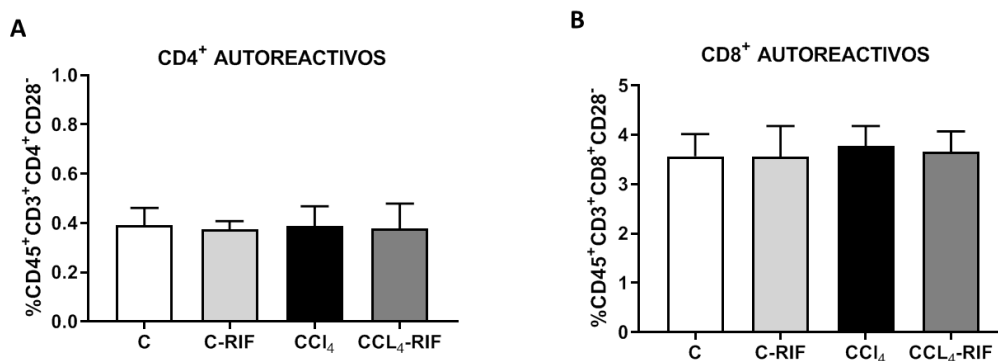


Figura 62. Las ratas con esteatohepatitis no muestran alteración de los linfocitos T autorreactivos. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) (negativos para CD28). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey.

11.2.4 Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento de linfocitos B que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Tras 4 semanas de administración de CCl_4 se observa un aumento significativo de linfocitos B (39.4 ± 2.77 % frente a 29.5 ± 0.40 %, $p < 0.05$) que se previene con rifaximina (28.7 ± 0.90 %, $p < 0.05$) (Figura 63).

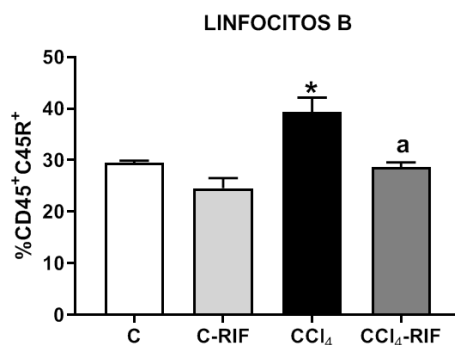


Figura 63. Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento de los linfocitos B que previene el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl_4 durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos B, positivos para el marcador CD45R. Los valores son la media \pm SEM de 3 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl_4 “a” $p < 0.05$.

11.2.5 Las ratas con esteatohepatitis no tienen activación de monocitos

Tras 4 semanas de administración de CCl_4 no se observa activación de monocitos (Figura 64).

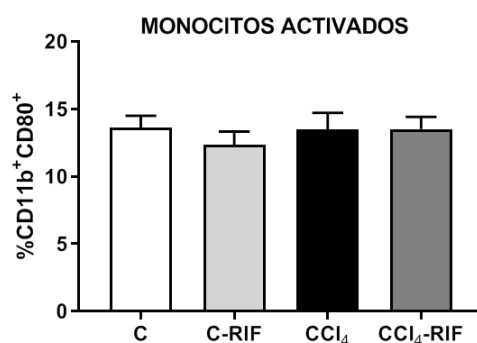


Figura 64. Las ratas con esteatohepatitis no muestran activación de monocitos. Se analizó en ratas inyectadas con CCl_4 durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de monocitos activados, positivos para CD11b y CD80. Los valores son la media \pm SEM de 7-9 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey.

11.3 Caracterización del inmunofenotipo en ratas con esteatohepatitis avanzada

En ratas con esteatohepatitis avanzada los porcentajes de linfocitos T *helper* o citotóxicos no están alterados, comparado con las ratas controles. La rifaximina tampoco altera estos porcentajes.

11.3.1 Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran un aumento de linfocitos T de memoria

Tras 8 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento del porcentaje de linfocitos T de memoria, tanto CD4⁺ (36.18 ± 1.82 % frente a 27.65 ± 0.68 %, $p < 0.05$) (Figura 65A) como CD8⁺ (30.81 ± 2.85 % frente a 20.73 ± 1.78 %, $p < 0.05$) (Figura 65C). El tratamiento con rifaximina previene el aumento de los linfocitos T de memoria CD4⁺ (28.87 ± 0.77 %, $p < 0.05$) y CD8⁺ (22.11 ± 1.82 %, $p < 0.05$).

En las ratas CCl₄ se observa una disminución del porcentaje de linfocitos T *naïve*, tanto CD4⁺ (57.50 ± 1.16 % frente a 66.17 ± 0.70 %, $p < 0.01$) (Figura 65B) como CD8⁺ (60.81 ± 1.56 % frente a 73.45 ± 1.95 %, $p < 0.01$) (Figura 65D). El tratamiento con rifaximina previene la disminución de linfocitos T *naïve* CD4⁺ (63.38 ± 1.06 %, $p < 0.05$) y CD8⁺ (69.75 ± 2.24 %, $p < 0.05$).

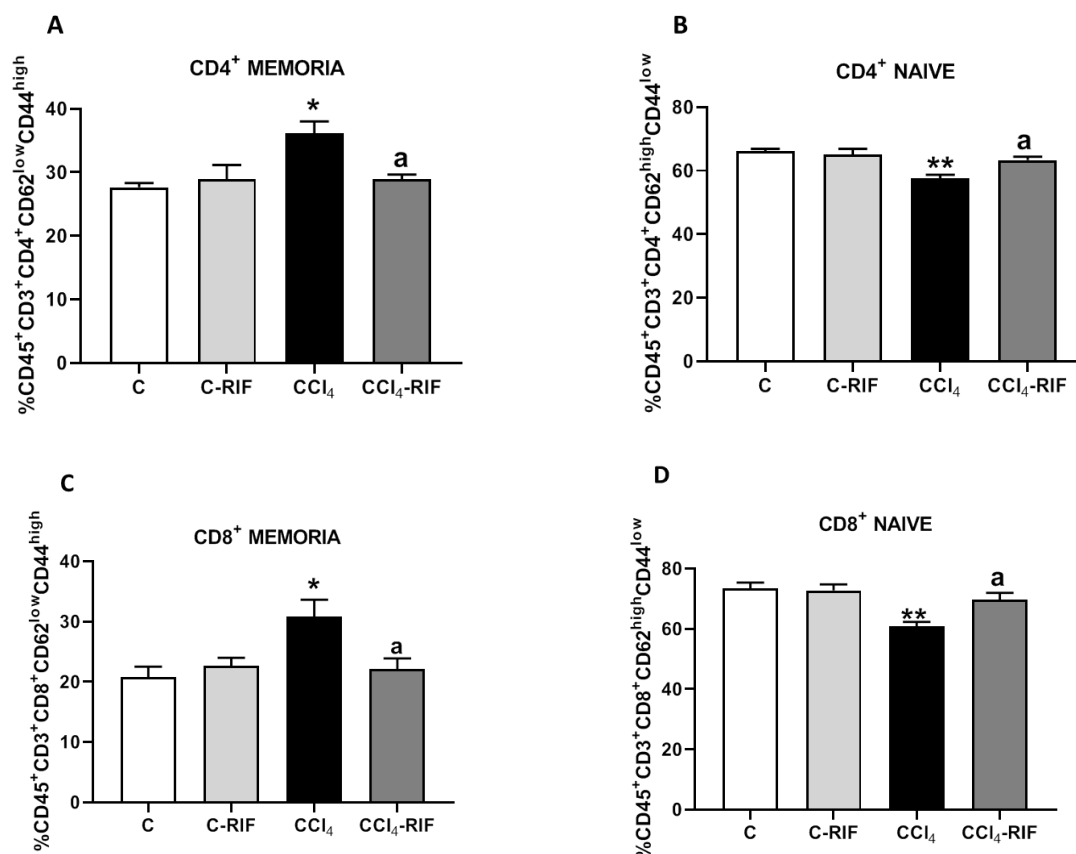


Figura 65. Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran un aumento de los linfocitos T de memoria que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 8 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T de memoria (que se identifican por una alta expresión del CD44 y una baja expresión del CD62L) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (C), y de los linfocitos T *naïve* (que tienen alta expresión del CD62L y baja expresión de CD44) CD4⁺ (B) y CD8⁺ (D). Los valores son la media \pm SEM de 4-6 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$.

11.3.2 Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran un aumento de linfocitos T reguladores CD4⁺ que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Tras 8 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento de linfocitos T reguladores CD4⁺ (5.97 ± 0.53 % frente a 3.83 ± 0.43 %, $p < 0.05$) (Figura 66A) pero no CD8⁺ (Figura 66B). El tratamiento con rifaximina previene el aumento de linfocitos T reguladores CD4⁺ (3.79 ± 0.46 %, $p < 0.05$) (Figura A).

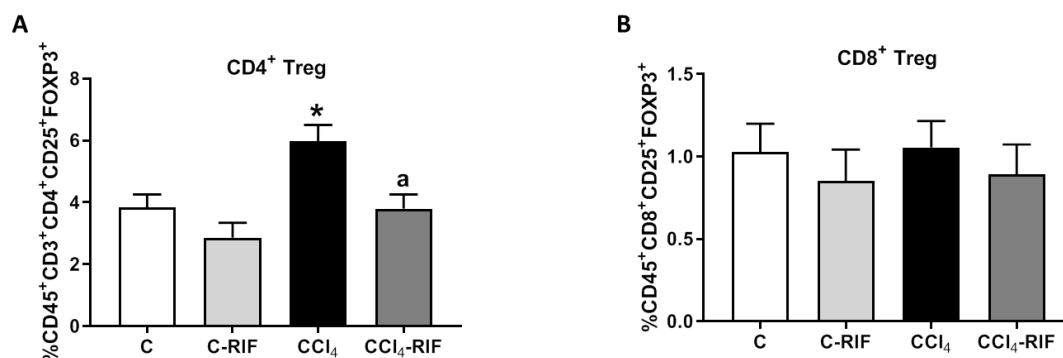


Figura 66. Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran un aumento de linfocitos T reguladores CD4⁺ que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 8 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T reguladores (marcados con CD25 y FoxP3) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05, “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” p<0.05.

11.3.3 Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran aumento de linfocitos T autorreactivos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Tras 8 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento de linfocitos T autorreactivos tanto CD4⁺ (2.76 ± 0.27 % frente a 1.64 ± 0.18 %, p<0.001) (Figura 67A) como CD8⁺ (7.36 ± 0.84 % frente a 4.38 ± 0.46 %, p<0.05) (Figura B). El tratamiento con rifaximina disminuye significativamente el porcentaje de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (1.70 ± 0.12 %, p<0.01) (Figura A) y CD8⁺ (4.22 ± 0.28 %, p<0.05) (Figura 67B).

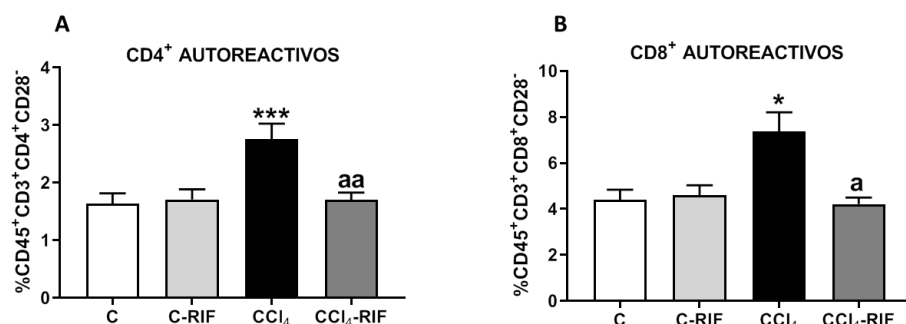


Figura 67. Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran aumento de linfocitos T autorreactivos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 8 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) (negativos para CD28). Los valores son la media \pm SEM de 16-18 ratas por cada grupo. En A los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En B los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05 ***p<0.001, y “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis “a” p<0.05, “aa” p<0.01.

11.3.4 Las ratas con esteatohepatitis avanzada no tienen alterados los niveles de linfocitos B

Tras 8 semanas de administración de CCl₄ no se observa ningún cambio en el porcentaje de linfocitos B (Figura 68).

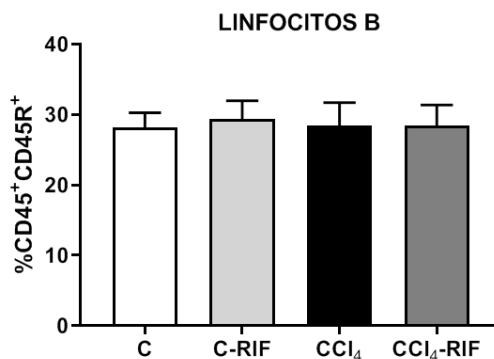


Figura 68. Las ratas con esteatohepatitis avanzada no muestran cambios en los linfocitos B. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 8 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos B, positivos para el marcador CD45R. Los valores son la media \pm SEM de 8-11 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey.

11.3.5 Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran activación de monocitos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Tras 8 semanas de administración de CCl₄ se observa activación de monocitos (23.5 ± 3.18 % frente a 11.7 ± 1.35 %, $p < 0.05$), que se previene mediante el tratamiento con rifaximina (12.8 ± 1.57 %, $p < 0.05$) (Figura 69).

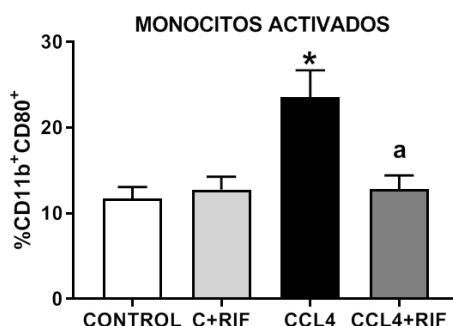


Figura 69. Las ratas con esteatohepatitis avanzada muestran activación de monocitos que se previene con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 8 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de monocitos activados, positivos para CD11b y CD80. Los valores son la media \pm SEM de 11-14 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, y "a" respecto a las ratas con esteatohepatitis "a" $p < 0.05$.

11.4 Caracterización del inmunofenotipo en ratas con cirrosis

En ratas con cirrosis los porcentajes de linfocitos T *helper* o citotóxicos no están alterados, comparado con las ratas controles. La rifaximina tampoco altera estos porcentajes.

11.4.1 Las ratas con cirrosis muestran un aumento de linfocitos T de memoria

Tras 12 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento del porcentaje de linfocitos T de memoria, tanto CD4⁺ (19.41 ± 0.62 % frente a 12.87 ± 1.16 %, $p < 0.01$) (Figura 70A) como CD8⁺ (29.91 ± 3.15 % frente a 17.74 ± 2.00 %, $p < 0.05$) (Figura 70C). El tratamiento con rifaximina previene el aumento de los linfocitos T de memoria CD4⁺ (15.05 ± 1.29 %, $p < 0.05$) y CD8⁺ (20.80 ± 1.80 %, $p < 0.05$).

En las ratas CCl₄ se observa una disminución del porcentaje de linfocitos T *naïve* CD4⁺ (60.49 ± 1.47 % frente a 70.10 ± 2.47 %, $p < 0.01$) (Figura 70B).

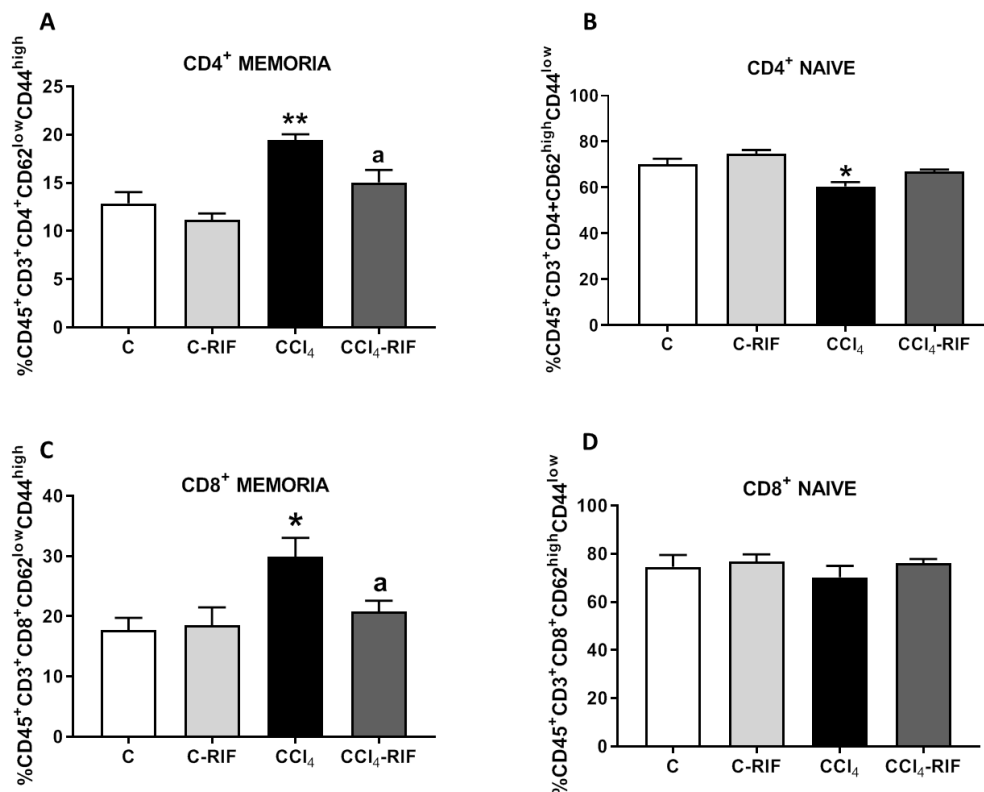


Figura 70. Las ratas con cirrosis muestran un aumento de linfocitos T de memoria que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T de memoria (que se identifican por una alta expresión del CD44 y una baja expresión del CD62L) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (C), y de los linfocitos T *naïve* (que tienen alta expresión del CD62L y baja expresión de CD44) CD4⁺ (B) y CD8⁺ (D). Los valores son la media \pm SEM de 4-7 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$.

11.4.2 Las ratas con cirrosis muestran un aumento de linfocitos T reguladores. Efectos del tratamiento con rifaximina

Tras 12 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento de linfocitos T reguladores tanto CD4⁺ (5.70 ± 0.51 % frente a 3.75 ± 0.29 %, $p < 0.05$) (Figura 71A) como CD8⁺ (0.48 ± 0.08 % frente a 0.28 ± 0.02 %, $p < 0.05$) (Figura 71B). El tratamiento con rifaximina previene el aumento de linfocitos T reguladores CD4⁺ (3.83 ± 0.47 %, $p < 0.05$) (Figura 71A), pero no de los CD8⁺ (Figura 71B).

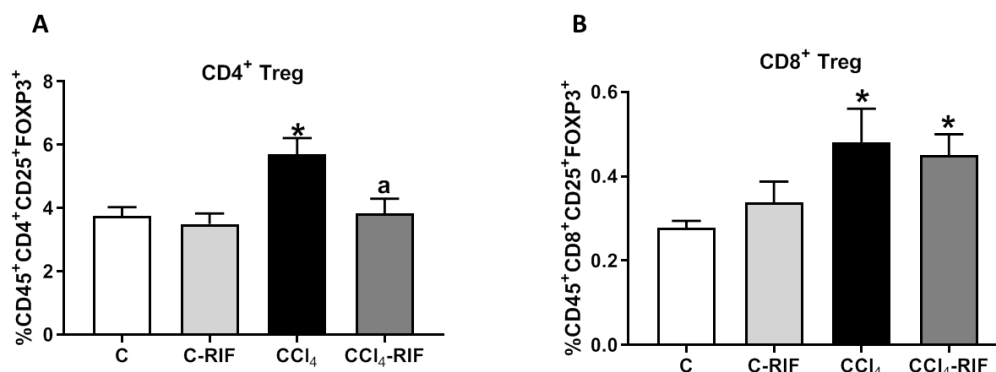


Figura 71. Las ratas con cirrosis muestran un aumento de linfocitos T reguladores. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T reguladores (marcados con CD25 y FoxP3) CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B). Los valores son la media \pm SEM de 6-12 ratas por cada grupo. En A los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. En B los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, "a" respecto a las ratas CCl₄ "a" $p < 0.05$.

11.4.3 Las ratas con cirrosis muestran aumento de linfocitos T autorreactivos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Tras 12 semanas de administración de CCl₄ se observa un aumento de linfocitos T autorreactivos tanto CD4⁺ (2.44 ± 0.26 % frente a 1.30 ± 0.12 %, $p < 0.01$) (Figura 72A) como CD8⁺ (7.26 ± 0.64 % frente a 4.74 ± 0.42 %, $p < 0.05$) (Figura 72B). El tratamiento con rifaximina no previene el aumento de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (Figura A) pero sí de los CD8⁺ (4.68 ± 0.42 %, $p < 0.05$) (Figura 72B). También se observa un aumento significativo de linfocitos T autorreactivos CD8⁺ en ratas control tratadas con rifaximina (8.29 ± 0.95 %, $p < 0.01$) (Figura 72B).

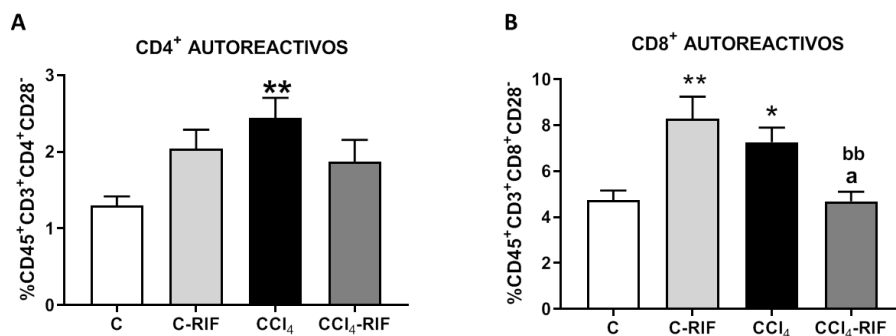


Figura 72. Las ratas con cirrosis muestran aumento de linfocitos T autorreactivos. Efectos del tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) (negativos para CD28). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control *p<0.05 **p<0.01, “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” p<0.05, y “b” respecto al grupo control tratado con rifaximina “bb” p<0.01.

11.4.4 Las ratas con cirrosis no tienen alterados los niveles de linfocitos B

Tras 12 semanas de administración de CCl₄ no se observa alteración significativa del porcentaje de linfocitos B (Figura 73).

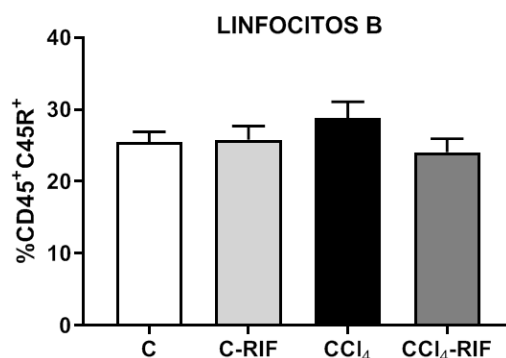


Figura 73. Las ratas con cirrosis no muestran cambios en los linfocitos B. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de linfocitos B, positivos para el marcador CD45R. Los valores son la media \pm SEM de 9-11 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey.

11.4.5 Las ratas con cirrosis muestran activación de monocitos que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Tras 12 semanas de administración de CCl₄ se observa activación de monocitos (20.79 ± 1.96 % frente a 15.11 ± 0.91 %, p<0.05), que se previene mediante el tratamiento con rifaximina (15.65 ± 1.13 %, p<0.05) (Figura 74).

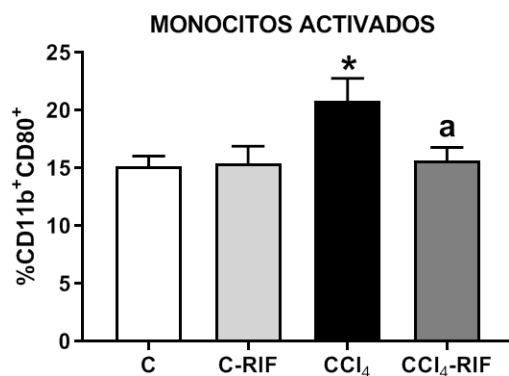


Figura 74. Las ratas con cirrosis muestran activación de monocitos que se previene con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 12 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo el contenido en sangre periférica de monocitos activados, positivos para CD11b y CD80. Los valores son la media \pm SEM de 8-10 ratas por cada grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, y “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis “a” $p < 0.05$.

12. Las ratas con fallo hepático inducido por CCl₄ presentan infiltración de linfocitos y macrófagos en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Analizamos si la inflamación periférica y los cambios en el inmunofenotipo inducen infiltración de células del sistema inmune en cerebelo.

12.1 Las ratas con esteatohepatitis presentan infiltración de linfocitos T CD4⁺ en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

Evaluamos la infiltración de linfocitos T en cerebelo mediante la cuantificación de linfocitos CD4⁺ en las meninges. A las 2 semanas, no se observa ninguna diferencia entre los grupos (Figura 75 A y C). Sin embargo, a las 4 semanas se verifica un aumento de la presencia de linfocitos T CD4⁺ (Figura 75 B y D) en meninges de cerebelo en ratas con esteatohepatitis (11.7 ± 1.85 células/cm² comparado con 5.45 ± 0.94 células/cm², $p < 0.05$), que se previene totalmente mediante el tratamiento con rifaximina (5.89 ± 1.32 células/cm², $p < 0.05$).

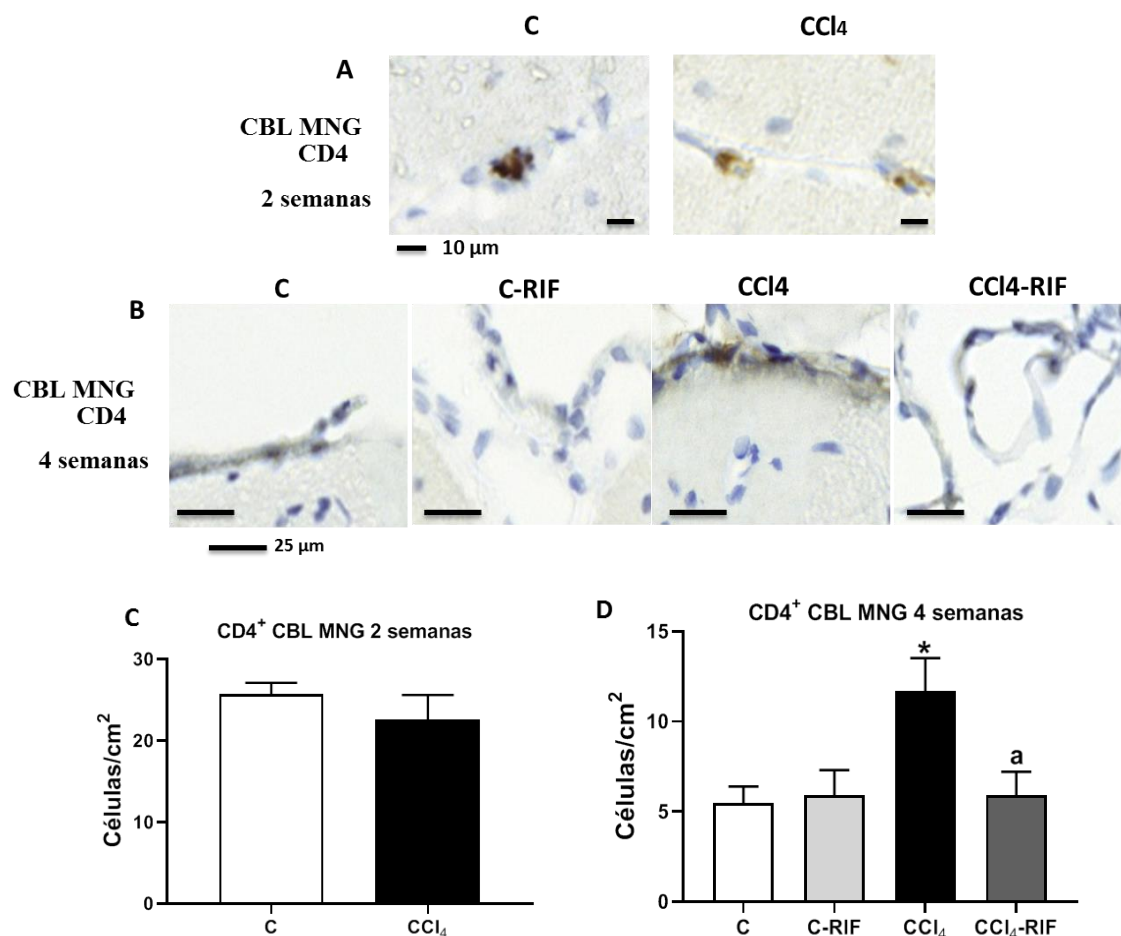


Figura 75. Las ratas con esteatohepatitis muestran infiltración de linfocitos T CD4⁺ en meninges de cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, infiltración de linfocitos T CD4⁺ en meninges de cerebelo (CBL MNG) por inmunohistoquímica con anti-CD4. Los valores son la media \pm SEM de 4-7 ratas por grupo en C y 9-12 ratas por grupo en D. En C los datos fueron analizados mediante un t-test de Student. En D los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$ y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$.

12.2 Las ratas con esteatohepatitis tienen infiltración de monocitos/macrófagos en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

También evaluamos la infiltración de monocitos/macrófagos en cerebelo mediante la cuantificación de células marcadas con IBA-1 en las meninges.

A las 2 semanas, no se observa ninguna diferencia entre los grupos (Figura 76 A y C), mientras que a las 4 semanas se verifica un aumento de monocitos/macrófagos (Figura 76 B y D) en meninges de cerebelo en ratas con esteatohepatitis (8.50 ± 0.53

células/mm comparado con 6.13 ± 0.33 células/mm, $p < 0.05$), que se previene mediante el tratamiento con rifaximina (6.07 ± 0.52 células/mm, $p < 0.05$).

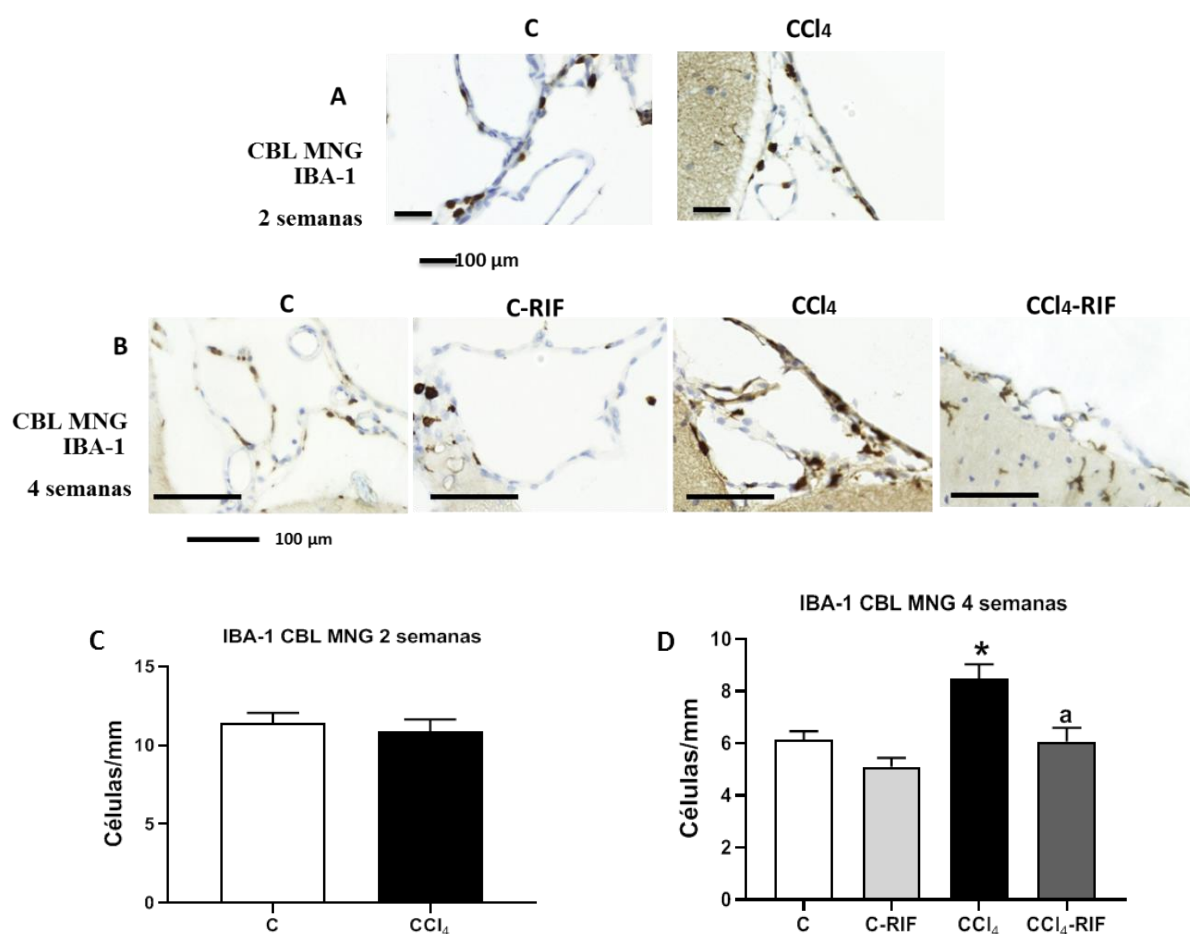


Figura 76. Las ratas con esteatohepatitis presentan infiltración de monocitos/macrófagos en meninges de cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) y tratadas con rifaximina o con su vehículo, infiltración de monocitos/macrófagos en meninges de cerebelo (CBL MNG) por inmunohistoquímica con anti-IBA-1. Los valores son la media \pm SEM de 4-6 ratas por grupo. En C los datos fueron analizados mediante un t-test de Student. En D los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$ y “a” respecto a las ratas CCl₄ “a” $p < 0.05$.

12.3 La infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos en el cerebelo es promovida por quimiocinas como CCL2, CCL20 y CX3CL1

Evalúamos si la infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos en el cerebelo está asociada a un aumento de quimiocinas. Tras 4 semanas de inyección de CCl₄, pero no tras 2 semanas, el contenido de CCL2 aumenta en el cerebelo de las ratas con esteatohepatitis, tanto en las neuronas de Purkinje (54.7 ± 3.06 comparado con 37 ± 2.5 u.a., $p < 0.001$) (Figura 77 A y C), como en sustancia blanca (156 ± 13.7 comparado con 43 ± 5.22 células/mm², $p < 0.0001$) (Figura 77 B y D) y en el cerebelo entero (167 ± 22.5 % del control, $p < 0.05$) (Figura 77 F). El aumento de CCL2 se previene mediante el tratamiento con rifaximina tanto en neuronas de Purkinje (42.5 ± 2.85 u.a., $p < 0.05$) (Figura 77 A y C), como en sustancia blanca (71 ± 8.05 células/mm², $p < 0.0001$) (Figura 77 B y D) y en el cerebelo entero (81 ± 8.26 % del control, $p < 0.01$) (Figura 77 F). También se observa un aumento del contenido de CCL2 en las neuronas de Purkinje a 4 semanas en ratas control tratadas con rifaximina (56.6 ± 3.46 u.a., $p < 0.0001$) (Figura 77 A y C).

No se observó aumento del contenido de CCL20 a las 2 semanas de insuficiencia hepática ni en meninges (Figura 78 A y E) ni en sustancia blanca (Figura 78 C y G), pero sí a las 4 semanas tanto en meninges (0.52 ± 0.08 comparado con 0.23 ± 0.06 células/mm, $p < 0.05$) (Figura 78 B y F) como en sustancia blanca (513 ± 34.7 comparado con 388 ± 18.3 células/mm², $p < 0.05$) (Figura 78 D y H). El tratamiento con rifaximina previene el aumento en las meninges (0.25 ± 0.05 células/mm, $p < 0.05$), pero induce un mayor aumento en sustancia blanca (574 ± 40 células/mm, $p < 0.01$).

Se observaron aumentos similares para CX3CL1 a las 4 semanas, tanto en las meninges (2.76 ± 0.24 comparado con 1.49 ± 0.22 células/mm, $p < 0.01$) (Figura 79 A y C) como en la sustancia blanca (369 ± 16.7 comparado con 307 ± 18.3 células/mm², $p < 0.05$) (Figura 79 B y D). La rifaximina previene el aumento tanto en las meninges (1.89 ± 0.28 células/mm, n.s.) como en la sustancia blanca (281 ± 15 células/mm², $p < 0.01$).

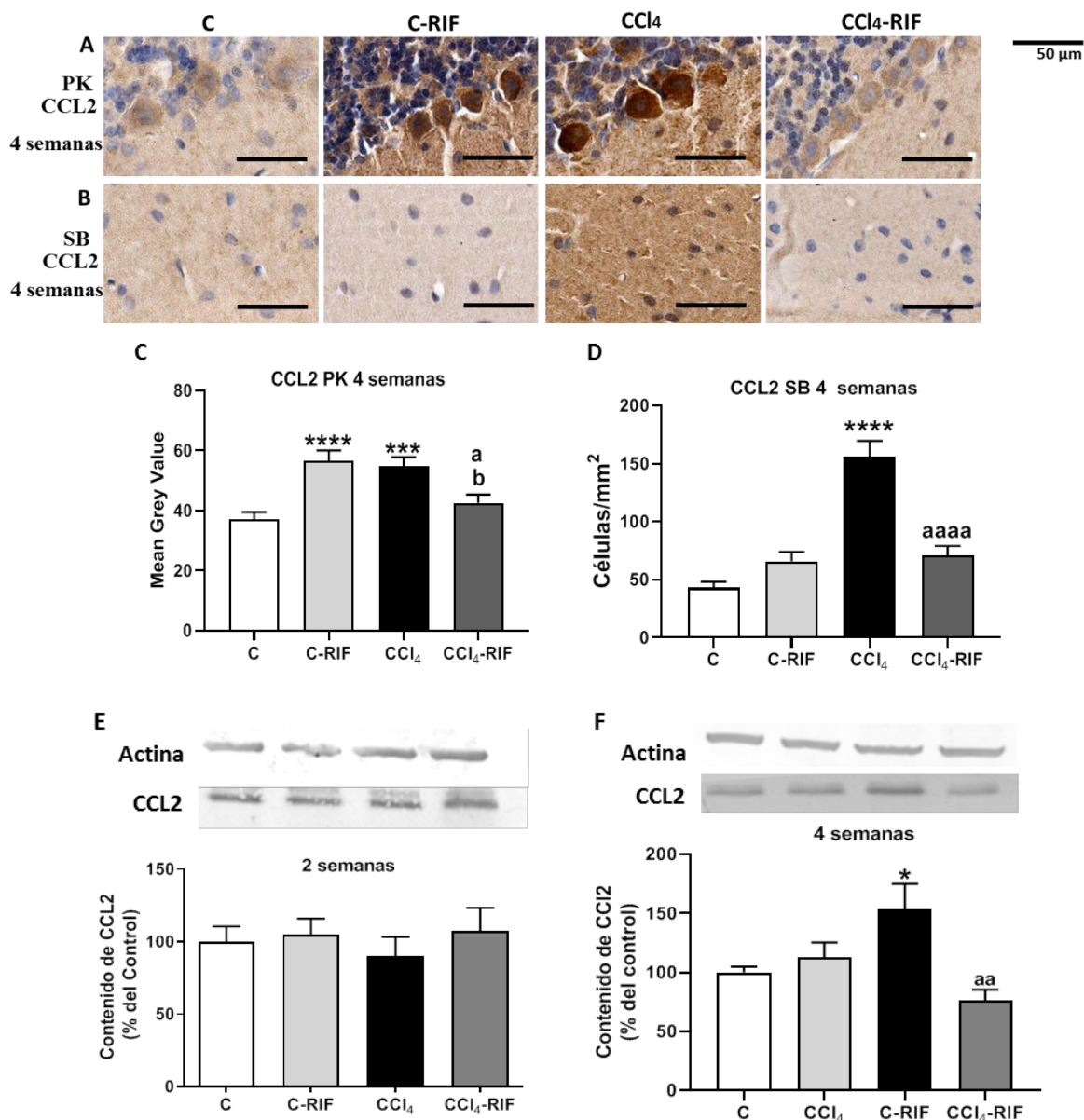


Figura 77. Las ratas con esteatohepatitis presentan aumento del contenido de CCL2 en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (E) y 4 (A, B, C, D, F) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de CCL2 en neuronas de Purkinje (PK) y sustancia blanca (SB) del cerebelo por inmunohistoquímica (Figura A-D) y en el cerebelo entero por western blot (Figura E-F). Los valores son la media \pm SEM de 2-3 ratas por grupo en A-D y 6-10 ratas por grupo en E-F. En C y E los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. En D y F los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl₄ “a” $p < 0.05$, “aa” $p < 0.01$, “aaa” $p < 0.0001$ y “b” respecto a las ratas control tratadas con rifaximina “b” $p < 0.05$.

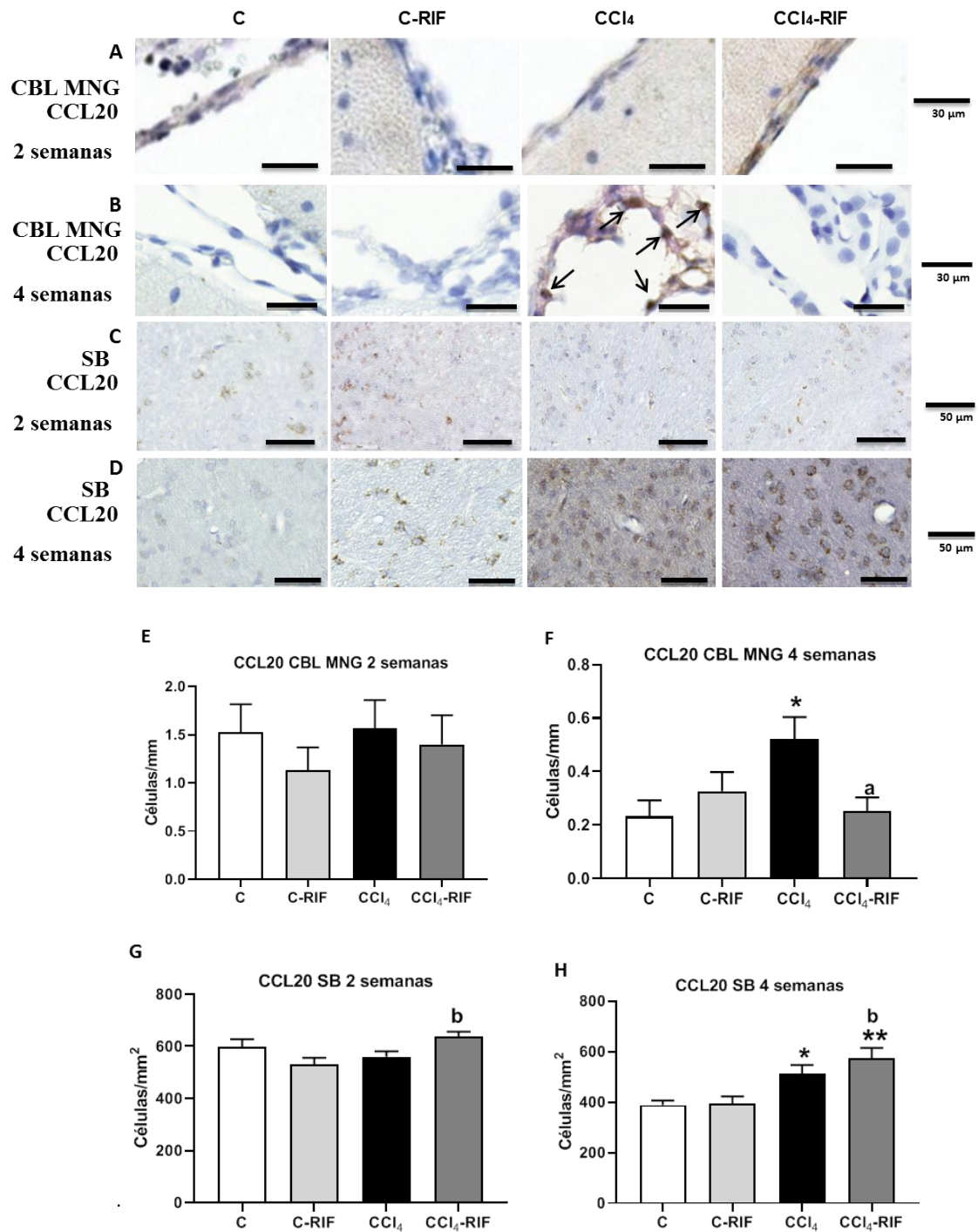


Figura 78. Las ratas con esteatohepatitis presentan aumento del contenido de CCL20 en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina en meninges pero no en sustancia blanca. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C, E, G) y 4 (B, D, F, H) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de CCL20 en meninges (MNG) y en sustancia blanca (SB) del cerebelo por inmunohistoquímica. Los valores son la media \pm SEM de 3-5 ratas por grupo. En E y F los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En G los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. En H los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * p <0.05, ** p <0.01, "a" respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl₄ "a" p <0.05, y "b" respecto a las ratas control tratadas con rifaximina "b" p <0.05.

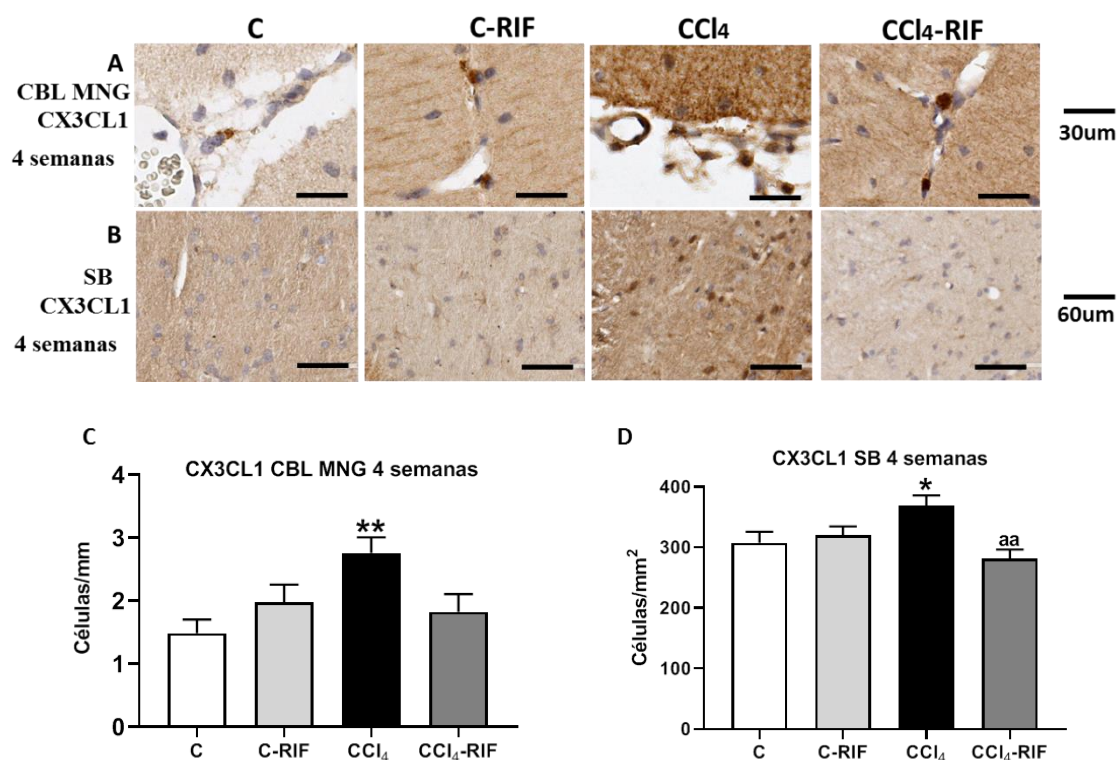


Figura 79. Las ratas con esteatohepatitis presentan aumento del contenido de CX3CL1 en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de CX3CL1 en meninges (MNG) (A, C) y en sustancia blanca (SB) (B, D) del cerebelo por inmunohistoquímica. Los valores son la media \pm SEM de 3-4 ratas por grupo. En C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En D los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y “aa” respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl₄ “a” $p < 0.01$.

12.4 La disminución de las proteínas de uniones estrechas ocludina y ZO-1 contribuye a la infiltración de células del sistema inmune en cerebelo de ratas con esteatohepatitis. La rifaximina previene su disminución

Para evaluar si la infiltración de linfocitos y macrófagos estuviera asociada con permeabilización de la barrera hematoencefálica, analizamos el contenido de las proteínas que forman uniones estrechas ocludina y ZO1. El contenido de ocludina se reduce fuertemente en el cerebelo de las ratas a las 2 semanas de inducir el daño hepático (62.1 ± 9.55 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 80 A), pero no a las 4 semanas (Figura 80 B). La proteína ZO-1 no está disminuida a las 2 semanas (Figura 80 C), pero sí a las 4 semanas (47.9 ± 9.66 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 80D). Esto

debe producir cierta permeabilización de la barrera hematoencefálica en ratas con esteatohepatitis. El tratamiento con rifaximina previene la reducción de ocludina (110 ± 12.2 % de los controles, $p < 0.05$) (Figura 80A) y de ZO-1 (77 ± 9.48 % de los controles, n.s.) (Figura 80D), evitando así la permeabilización de la barrera.

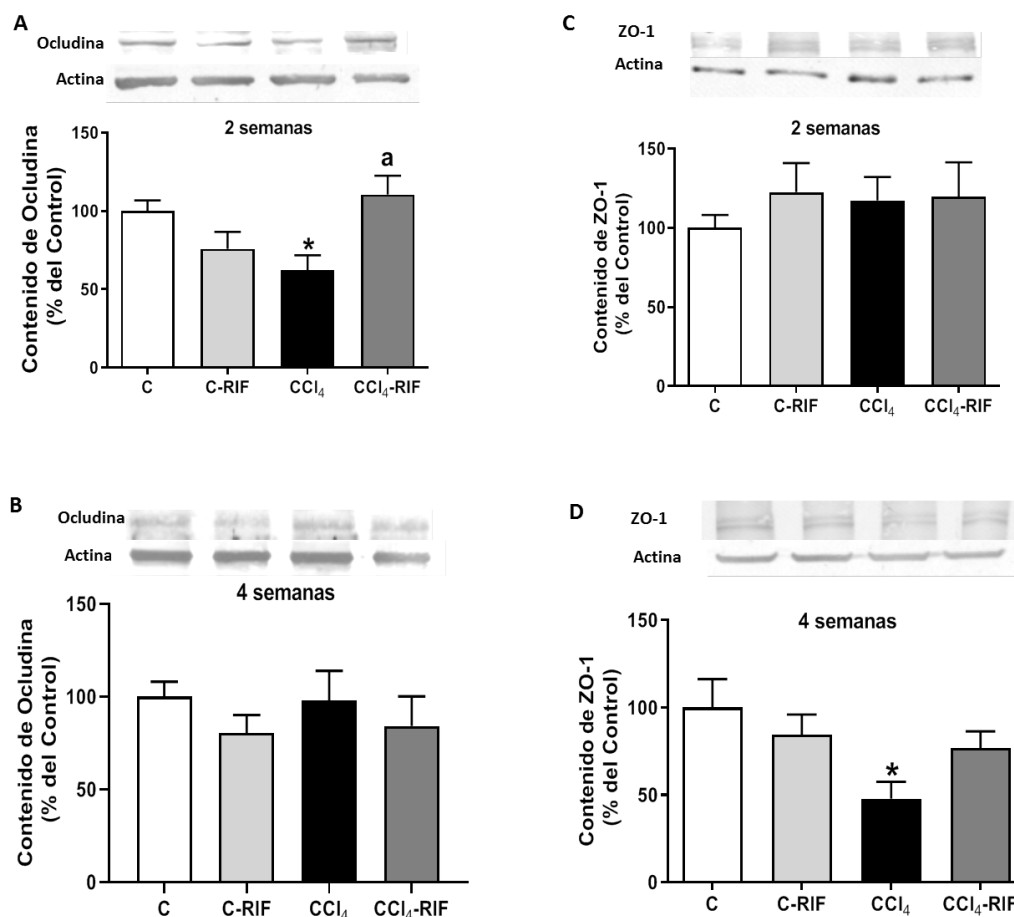


Figura 80. Las ratas con esteatohepatitis presentan disminución del contenido de ocludina y ZO-1 en cerebelo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de ocludina y ZO-1 mediante western blot. Los valores son la media \pm SEM de 7-10 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$ y “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl₄ “a” $p < 0.05$.

13. Las ratas con fallo hepático inducido por CCl₄ presentan infiltración de linfocitos y macrófagos en hipocampo. Efectos del tratamiento con rifaximina

Analizamos si la inflamación periférica y los cambios en el inmunofenotipo inducen infiltración de células del sistema inmune en hipocampo.

13.1 Las ratas con esteatohepatitis presentan infiltración de linfocitos T CD4⁺ en hipocampo que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina

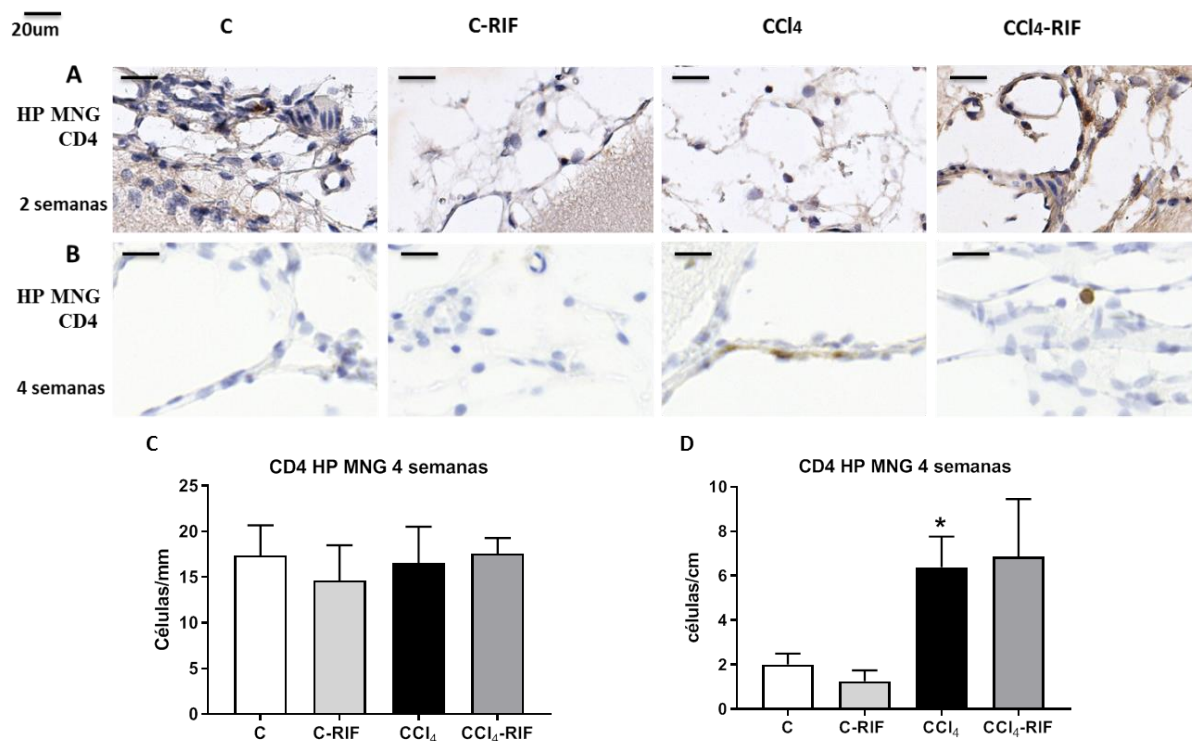


Figura 81. Las ratas con esteatohepatitis muestran infiltración de linfocitos T CD4⁺ en meninges de hipocampo que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, infiltración de linfocitos T CD4⁺ en meninges (MNG) de hipocampo por inmunohistoquímica con anti-CD4. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. En D los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$.

Evaluamos la infiltración de linfocitos T en hipocampo mediante la cuantificación de linfocitos CD4⁺ en las meninges y en los plexos coroideos de los ventrículos laterales.

A las 2 semanas no se observa infiltración de linfocitos T CD4⁺ en meninges de hipocampo (Figura 81 A y C) ni en los plexos coroideos de los ventrículos laterales (Figura 82 A y C). A las 4 semanas se verifica un aumento de la presencia de linfocitos T CD4⁺ (Figura 81 B y D) en meninges de hipocampo en ratas con esteatohepatitis (6.4 ± 1.39 células/cm comparado con 2 ± 0.49 células/cm, $p < 0.05$), que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina (6.9 ± 2.59 células/cm, n.s.). Asimismo a 4 semanas se observa un aumento de linfocitos T CD4⁺ (Figura 82 B y D) en los plexos coroideos de los ventrículos laterales (13.2 ± 3.67 células/cm comparado con 3.8 ± 0.79

células/cm, $p<0.05$), que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina (13.1 ± 1.84 células/cm, $p<0.05$).

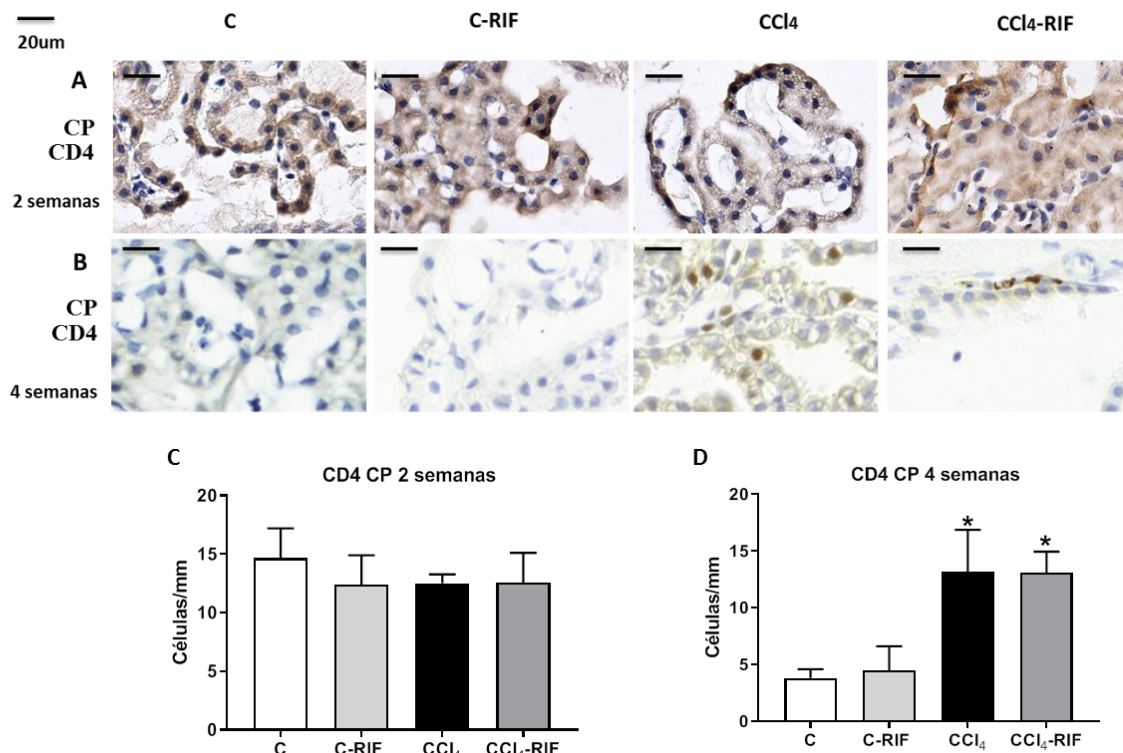


Figura 82. Las ratas con esteatohepatitis muestran infiltración de linfocitos T CD4⁺ en los plexos coroideos de los ventrículos laterales que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, infiltración de linfocitos T CD4⁺ en los plexos coroideos (CP) de los ventrículos laterales por inmunohistoquímica con anti-CD4. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo en D. En D los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p<0.05$.

13.2 Las ratas con esteatohepatitis tienen infiltración de monocitos/macrófagos en hipocampo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina

También evaluamos la infiltración de monocitos/macrófagos en hipocampo mediante la cuantificación de células marcadas con IBA-1 en las meninges y en los plexos coroideos de los ventrículos laterales.

A las 2 semanas, no se observa ninguna diferencia entre los grupos (Figura 83 A y C), mientras que a las 4 semanas se verifica un aumento de monocitos/macrófagos (Figura 83 B y D) en meninges de hipocampo en ratas con esteatohepatitis (10 ± 0.59 células/mm comparado con 7.9 ± 0.50 células/mm, $p<0.01$), que se previene mediante el tratamiento con rifaximina (5 ± 0.56 células/mm, $p<0.0001$). Además, la rifaximina en

ratas con esteatohepatitis induce disminución del número de monocitos/macrófagos comparado con ratas control y ratas control tratadas con rifaximina ($p<0.01$ y $p<0.05$ respetivamente). Asimismo en los plexos coroideos de los ventrículos laterales a 2 semanas no se observan diferencias entre grupos (Figura 84 A y C), mientras que a 4 semanas se verifica un aumento de monocitos/macrófagos (Figura 84 B y D) en ratas con esteatohepatitis (10.3 ± 0.96 células/mm comparado con 6.9 ± 0.30 células/mm, $p<0.01$), que se previene totalmente mediante el tratamiento con rifaximina (5.9 ± 0.42 células/mm, $p<0.001$).

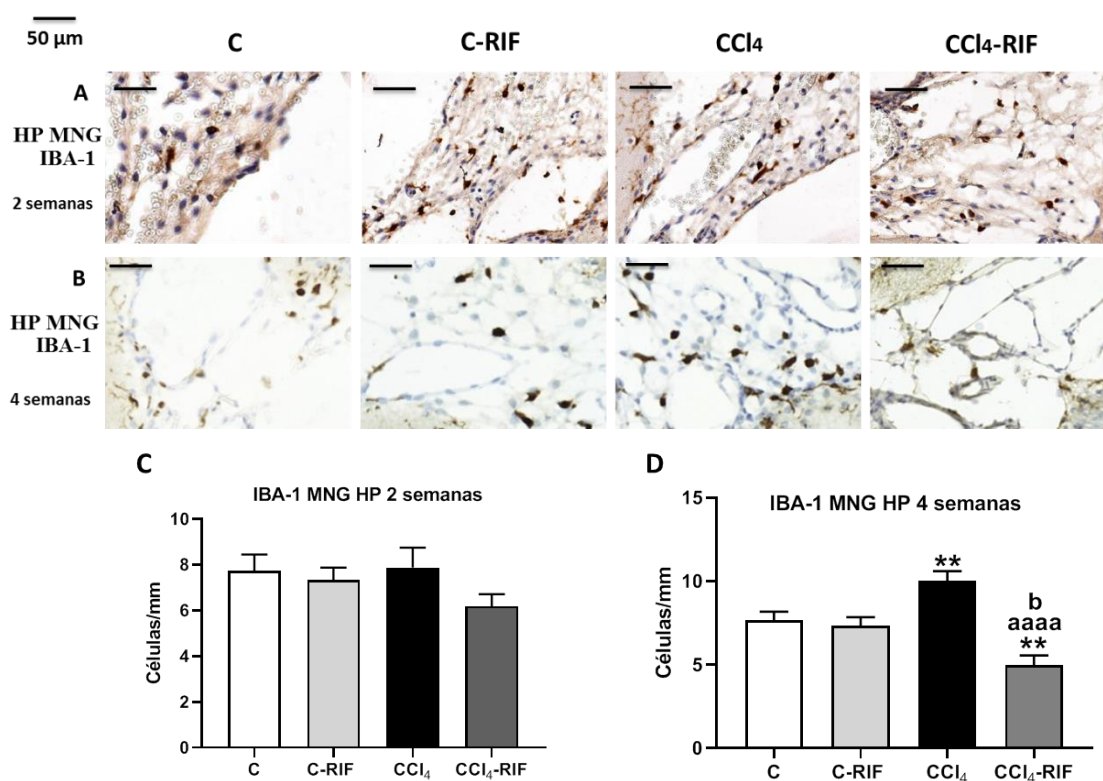


Figura 83. Las ratas con esteatohepatitis presentan infiltración de monocitos/macrófagos en meninges de hipocampo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, infiltración de monocitos/macrófagos en meninges de hipocampo (HP MNG) por inmunohistoquímica con anti-IBA-1. Los valores son la media \pm SEM de 3-4 ratas por grupo. En C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En D los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p<0.01$, “a” respecto a las ratas CCl₄ “aaaa” $p<0.0001$ y “b” respecto a las ratas control tratadas con rifaximina “b” <0.05 .

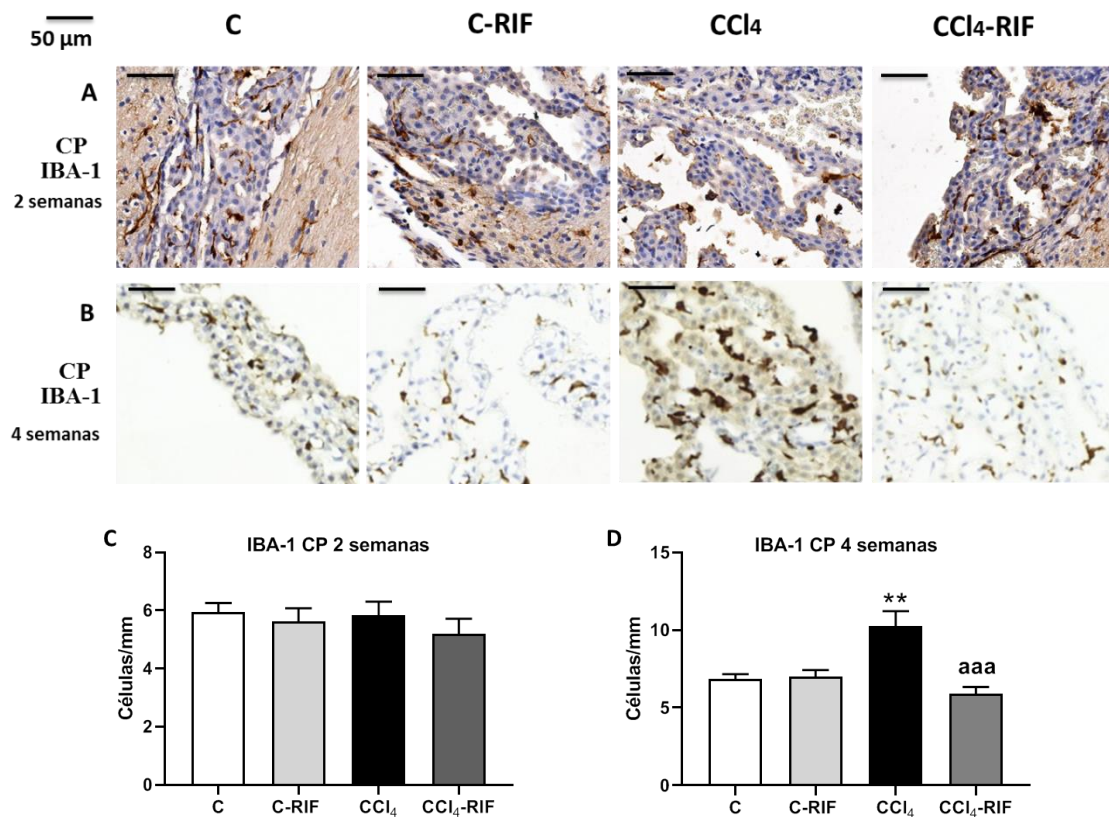


Figura 84. Las ratas con esteatohepatitis presentan infiltración de monocitos/macrófagos en los plexos coroideos de los ventrículos laterales que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, infiltración de monocitos/macrófagos en los plexos coroideos (CP) de los ventrículos laterales por inmunohistoquímica con anti-IBA-1. Los valores son la media \pm SEM de 3-4 ratas por grupo. En C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. En D los datos fueron analizados mediante un Welch's ANOVA test y test de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control ** $p < 0.01$ y "a" respecto a las ratas CCl₄ "aaa" $p < 0.001$.

13.3 La infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos en hipocampos es promovida por quimiocinas como CCL2 y CCL20

Evaluamos si la infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos en el hipocampo está asociada a un aumento de quimiocinas.

Tras 4 semanas de inyección de CCl₄, pero no tras 2 semanas (Figura 85 A y C), el contenido de CCL2 aumenta en la región CA1 del hipocampo de las ratas con esteatohepatitis (19.4 ± 1.04 comparado con 12.4 ± 0.60 u.a., $p < 0.0001$) (Figura 85 B y D). Este aumento de CCL2 se previene mediante el tratamiento con rifaximina (15.1 ± 1.12 u.a., $p < 0.05$) (Figura 86 B y D). También se observa un aumento del contenido de CCL2 a 4 semanas en ratas control tratadas con rifaximina (16 ± 1.09 u.a., $p < 0.05$).

A las 4 semanas también se observa aumento del contenido de CCL20 en meninges (2.7 ± 0.32 comparado con 1.5 ± 0.22 células/mm, $p < 0.05$) (Figura 86 A y B), y el tratamiento con rifaximina induce un mayor aumento (2.96 ± 0.41 células/mm, $p < 0.01$). Además, la rifaximina aumenta significativamente el contenido de CCL20 en ratas con esteatohepatitis comparado con ratas control rifaximina ($p < 0.05$).

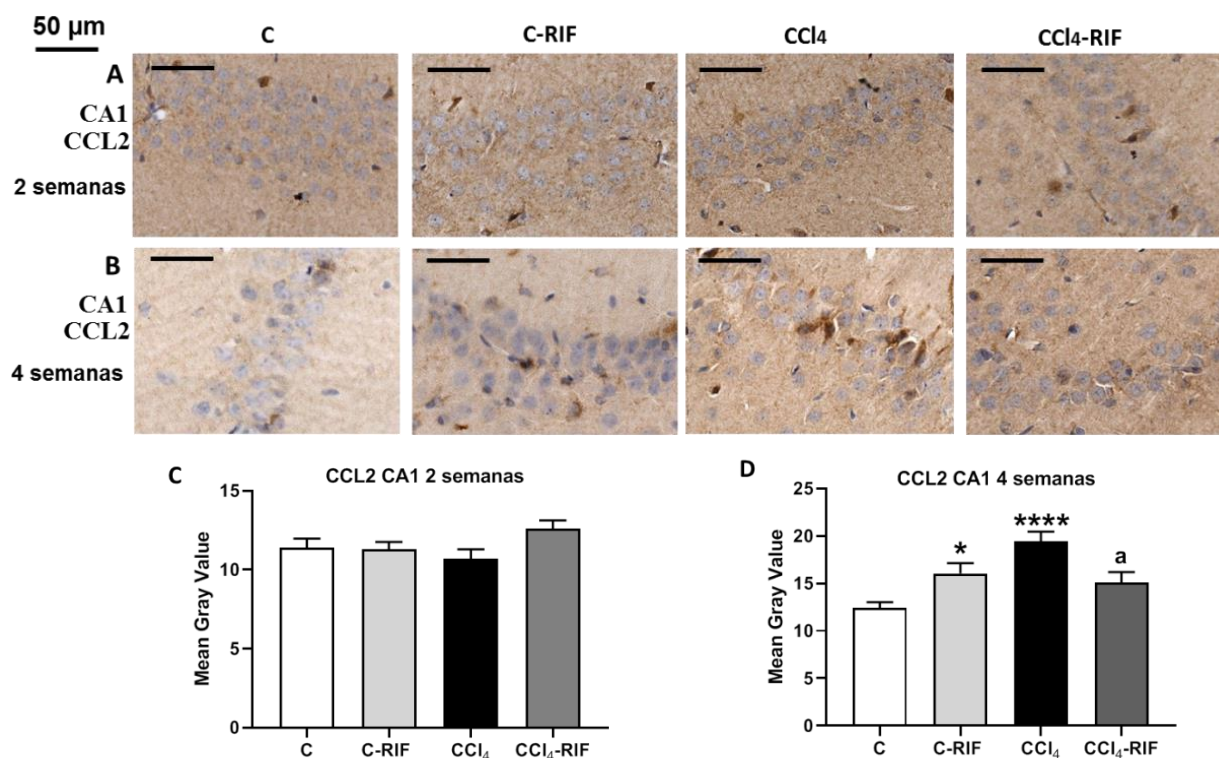


Figura 85. Las ratas con esteatohepatitis presentan aumento del contenido de CCL2 en la región CA1 del hipocampo que se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ durante 2 (A, C) y 4 (B, D) semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de CCL2 cerebelo por inmunohistoquímica. Los valores son la media \pm SEM de 2-4 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ y “a” respecto a las ratas con esteatohepatitis inducida por CCl₄ “a” $p < 0.05$.

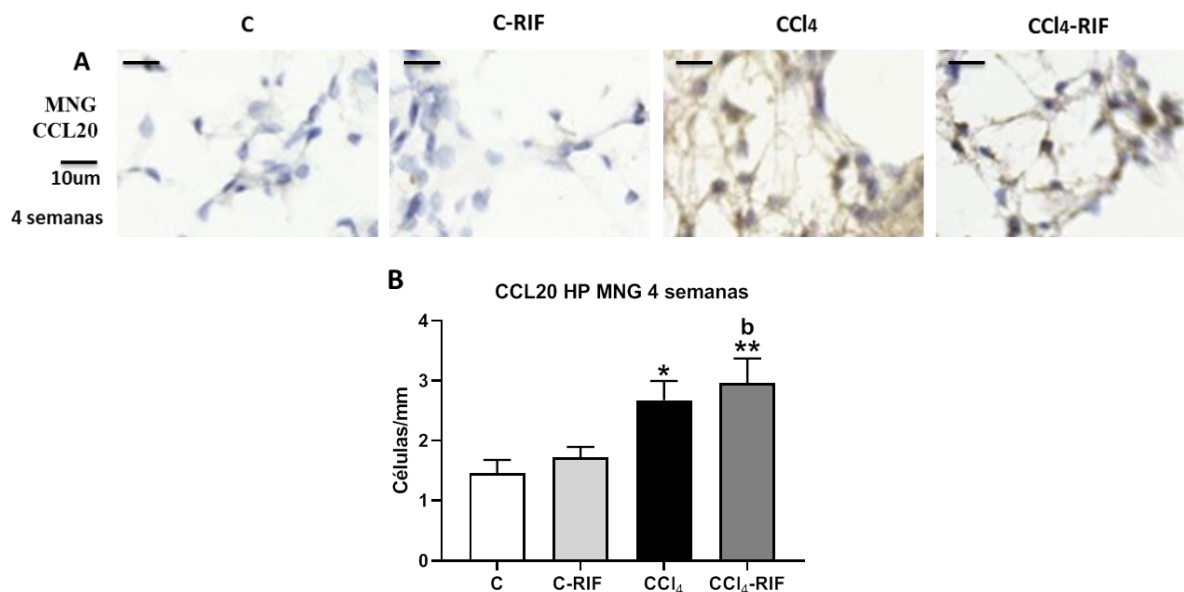


Figura 86. Las ratas con esteatohepatitis presentan aumento del contenido de CCL20 en meninges de hipocampo que no se previene mediante el tratamiento con rifaximina. Se analizó en ratas inyectadas con CCl₄ 4 semanas y tratadas con rifaximina o con su vehículo, el contenido de CCL20 en meninges (MNG) (A y B) de hipocampo por inmunohistoquímica. Los valores son la media \pm SEM de 2-4 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un test post hoc de Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y “b” respecto a las ratas control tratadas con rifaximina “b” < 0.05 .

DISCUSIÓN

1. Mecanismos que contribuyen al deterioro cognitivo y motor en EHM

El primer objetivo de este trabajo fue caracterizar las alteraciones cognitivas y motoras que se producen tras el daño hepático en ratas y en qué momento aparecen, es decir, cual es el mínimo grado de daño hepático que produce alteraciones neurológicas.

Al mismo tiempo se han analizado los mecanismos por los que se producen las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en los diferentes grados de daño hepático. Se ha analizado la contribución de la neuroinflamación y las alteraciones en la neurotransmisión asociadas.

1.1 Deterioro de la coordinación motora. Alteraciones en cerebelo

La tabla 12 resume las alteraciones en la coordinación motora y en algunos parámetros de la neurotransmisión y la neuroinflamación en cerebelo de ratas con daño hepático.

Tabla 12. Alteraciones en la coordinación motora y en la neurotransmisión y neuroinflamación en cerebelo de ratas con esteatohepatitis y cirrosis

	Efecto del daño hepático (esteatohepatitis y cirrosis)	Normalización por rifaximina
Coordinación motora en el rotarod	↓ (solo en esteatohepatitis)	N
Coordinación motora en beam walking	↓	N
Discriminación condicionada	↓ (en esteatohepatitis)	N
Glutamato extracelular	↑	N
GABA extracelular	↑	N
Expresión en membrana de GAT1	↓	N
Contenido total de GAT3	↑ (solo en esteatohepatitis)	N
Expresión en membrana de GLAST	↓	N
Activación de microglía	↑	N
Activación de astrocitos	↑	N
TNFα en Purkinje y sustancia blanca	↑	N (solo en esteatohepatitis)
Pérdida de neuronas de Purkinje	↑	N
Pérdida de neuronas granulares	↑	N (solo en esteatohepatitis)

↑ = aumentado en fallo hepático; ↓ = disminuido en fallo hepático; N = normalización por la rifaximina

Las ratas con daño hepático crónico inducido por CCl₄ presentan alteración de la coordinación motora a partir del estadio de esteatohepatitis, y la alteración se mantiene en la fase de cirrosis.

El cerebelo modula la coordinación motora. La incoordinación motora se debe, al menos en parte, a un aumento de GABA extracelular en el cerebelo y a la activación de sus receptores GABA_A. Estudios previos en otros modelos de EHM demuestran que el aumento de GABA extracelular se produce por alteración de la expresión en membrana de los transportadores de GABA y que estas alteraciones se inducen por neuroinflamación (Hernández-Rabaza et al., 2016b; Dadsetan et al., 2016a; Cabrera-Pastor et al., 2018). Por ello, analizamos si en este modelo de daño hepático, en sus diferentes grados, se producen estas alteraciones. En ratas con esteatohepatitis, que ya muestran incoordinación motora, hemos comprobado que está aumentado el GABA extracelular en el cerebelo y que hay una disminución de la expresión en membrana del transportador GAT-1 y un aumento de GAT-3. Entre los transportadores del GABA, GAT-1 se expresa principalmente en neuronas y específicamente en las terminaciones presinápticas de los axones, mientras que GAT-3 se localiza principalmente en los astrocitos perisinápticos (Zafar y Ishrat, 2018). En astrocitos activados, en situaciones patológicas, con neuroinflamación, GAT3 cambia su función y en lugar de recaptar GABA lo libera al medio extracelular, contribuyendo también al aumento de GABA extracelular (Hernández-Rabaza et al., 2016a; Agusti et al., 2017). El aumento de GABA extracelular, por tanto, se debería a la reversión de la función de GAT-3 en los astrocitos activados y a la reducción de la expresión en membrana del transportador GAT-1 en las neuronas.

Cabrera-Pastor et al. (2018) mostraron que en ratas con hiperamonemia crónica la reversión de la función de GAT-3 se debe a una mayor expresión de NF-κB en la microglía activada, como consecuencia de la activación del receptor TNFR1 por el TNFα, que está aumentado. El factor de transcripción NF-κB activa la transcripción de glutaminasa, que a su vez aumenta los niveles de glutamato extracelular y conduce a un mayor transporte de glutamato y sodio por los astrocitos activados a través de los transportadores GLT1 y GLAST. El aumento de sodio intracelular reduce el gradiente de sodio y conduce a la reversión de la función de GAT-3.

En cerebelo la alteración de la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica es consecuencia de la neuroinflamación. En ratas con esteatohepatitis están activados la microglía y los astrocitos. Hay un aumento de TNFα en el cerebelo que debe ser el responsable de activar TNFR1 y aumentar NF-κB en microglía, lo que finalmente conduce al aumento de GABA extracelular produciendo incoordinación motora.

El tratamiento con rifaximina previene la activación de los astrocitos y revierte la activación de la microglía, así como el aumento de TNF α . Así, previniendo la neuroinflamación, la rifaximina normaliza los niveles extracelulares de glutamato y la expresión en membrana de los transportadores de GABA y los niveles de GABA extracelular. Esto conduce a la restauración de la coordinación motora en ratas con esteatohepatitis.

Los resultados muestran que en ratas control la rifaximina produce un aumento de GABA extracelular, y en consecuencia un ligero aumento de resbalones en el beam walking, es decir, cierta incoordinación motora. Sin embargo, no se ha observado alteración en la expresión en membrana de transportadores de GABA, aunque pudiera estar afectada su función y no su expresión. En estas ratas control tratadas con rifaximina no hay activación de microglía ni astrocitos, aunque sí cierto aumento de TNF α que podría contribuir al aumento de GABA extracelular inducido por la rifaximina.

En el cerebelo de ratas hiperamonémicas y con anastomosis porta-cava (PCS) el aumento del tono GABAérgico, inducido por la neuroinflamación, contribuye a la disminución de la función de la vía glutamato-NO-GMPc, y a la subsiguiente alteración del aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Cauli et al, 2007b; Cabrera-Pastor et al., 2016b; Agusti et al., 2011; Dadsetan et al. 2016a; Hernández-Rabaza et al, 2016a 2016b). Nuestro grupo ha demostrado que reduciendo la activación de los receptores GABA_A con bicuculina, sulfato de pregnenolona o GR3027, se reduce el tono GABAérgico, con la consecuente restauración de la función de la vía glutamato-NO-cGMP y de la capacidad de aprender la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Cauli et al., 2009a; Gonzalez-Usano et al., 2014; Johansson et al., 2015).

En ratas con esteatohepatitis está también disminuida la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y, y el aumento del GABA extracelular en cerebelo sería el responsable de esta alteración cognitiva. La rifaximina también mejora la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y, lo cual sería consecuencia de la normalización del tono GABAérgico en el cerebelo de ratas con esteatohepatitis.

Las ratas con esteatohepatitis muestran pérdida neuronal en las capas del Purkinje y granular. Balzano et al. (2018) mostraron que pacientes fallecidos con esteatohepatitis

presentaban degeneración tanto de neuronas del Purkinje como granulares en el cerebelo. Esta neurodegeneración se asoció a neuroinflamación e infiltración de células del sistema inmune. Los autores sugieren que la pérdida neuronal en estos pacientes sería consecuencia de la activación de microglía, que de normal fagocita neuronas muertas o en degeneración, pero puede también fagocitar neuronas vivas mediante un proceso llamado “fagoptosis”. El estrés inflamatorio debido a la activación de las células gliales, junto con niveles moderados de peroxinitrito, inducen a las neuronas a exponer la fosfatidilserina, promoviendo su propia fagocitosis por parte de la microglía (Brown y Neher, 2014). Además, la formación de peroxinitrato contribuiría a la sinergia entre hiperamonemia e inflamación periférica en la inducción del deterioro cognitivo y motor en pacientes con EHM (Gimenez-Garzó et al., 2015).

Normalizando la activación de las células gliales y los niveles de $\text{TNF}\alpha$, la rifaximina previene la pérdida neuronal en la capa de Purkinje y la detiene completamente en la capa granular en el estadio de esteatohepatitis.

Los resultados obtenidos en ratas con esteatohepatitis concuerdan con estudios previos del grupo que muestran que las alteraciones neurológicas aparecen en las primeras etapas de la enfermedad hepática, incluso antes de llegar a cirrosis. Los pacientes con esteatohepatitis no alcohólica, sin cirrosis hepática pero con niveles elevados de hiperamonemia e inflamación muestran deterioro cognitivo (Felipo et al., 2012b). Además, en el cerebelo de pacientes con esteatohepatitis se ha encontrado neuroinflamación, infiltración de células del sistema inmune y neurodegeneración (Balzano et al., 2018). Las alteraciones neurológicas tempranas asociadas a la enfermedad hepática afectan el cerebelo antes que otras áreas cerebrales (Rodrigo et al., 2010; Felipo, 2014). Felipo et al. (2014) mostraron que en pacientes cirróticos la medida no invasiva por resonancia magnética del flujo sanguíneo en el cerebelo detecta la EHM antes que los tests psicométricos. En este estudio se observó que el flujo sanguíneo aumenta en el cerebelo en pacientes cirróticos con EHM, pero no en otras áreas cerebrales, y correlaciona con diferentes pruebas psicométricas, con los metabolitos del NO y con la 3-nitrotirosina. Estos resultados indican que el cerebelo es la primera área cerebral en la que se observan las alteraciones neurológicas asociadas a la EHM, y que estas se producen antes de poder ser detectadas por la batería PHES. Además, en pacientes cirróticos, la ataxia, el temblor, la desaceleración de los movimientos de los dedos, la coordinación bimanual y la visuo-motora indican

anomalías a nivel del cerebelo, y estas alteraciones aparecen de forma temprana en pacientes sin EHM diagnosticada por el PHES (Butz et al., 2010; Felipe et al., 2012a; Gimenez-Garzó et al., 2017). Todas estas son funciones motoras controladas primariamente por el cerebelo, y por lo tanto estos datos avalan la hipótesis de que el cerebelo una de las primeras regiones del cerebro que se afecta en EHM.

Las ratas con cirrosis siguen presentando incoordinación motora en el test del beam walking, pero no en el rotarod. En estas ratas la expresión en membrana en cerebelo de GAT1 sigue disminuida, mientras que la de GAT3 ya no está aumentada. Esto sugiere que la disminución de la expresión en membrana de GAT-1 debe ser suficiente para inducir aumento del tono GABAérgico e incoordinación motora en el test del beam walking pero no en rotarod. Otra posibilidad es que el mayor peso y tamaño de las ratas en esta situación, haga que la permanencia en el rotarod sea menor en las ratas control y esto hace que ya no se observe alteración de la coordinación motora en las ratas con cirrosis hepática. Aunque estas ratas siguen presentando activación de células gliales y aumento de $\text{TNF}\alpha$ en el cerebelo, responsables de las alteraciones en la neurotransmisión y por lo tanto de la incoordinación motora, ya no observamos el aumento de GAT3, lo cual puede ser porque otros mecanismos, inducidos por el mayor daño hepático o por mecanismos de adaptación, disminuyen su expresión. En el estadio de cirrosis la pérdida neuronal se mantiene en la capa granular y aumenta levemente en la de Purkinje.

En ratas con cirrosis la rifaximina ya no consigue prevenir el aumento de $\text{TNF}\alpha$, aunque sí se previene la activación de astrocitos y se reduce la de microglía. A pesar de ello, el tratamiento con rifaximina restaura la coordinación motora normalizado las alteraciones en la expresión en membrana de GAT-1. Estos datos sugieren que en el estadio de cirrosis, la rifaximina debe revertir la expresión en membrana de GAT-1 y la incoordinación motora actuando en otros pasos de la vía, después del aumento de $\text{TNF}\alpha$, o por otros mecanismos independientes.

Además, la rifaximina en las ratas cirróticas induce una disminución significativa de la expresión de GAT3 y de GFAP, por debajo de los niveles de las ratas control. Ambos efectos podrían ser debidos a una disminución del contenido de astrocitos, por estar disminuida su proliferación o aumentada su muerte. En ratas cirróticas la rifaximina sigue previniendo la pérdida de neuronas de Purkinje, pero aumenta la pérdida de neuronas granulares. Estos resultados sugieren que el tratamiento a largo plazo con

rifaximina, en cirrosis, puede tener efectos adicionales como la inducción de pérdida de astrocitos y neuronas granulares en el cerebelo. En las ratas control tratadas con rifaximina durante 10 semanas también se observa activación de microglía y pérdida de neuronas granulares indicando que el tratamiento crónico con rifaximina por si mismo puede inducir, en ratas sin daño hepático, cierta neuroinflamación y neurodegeneración, probablemente por alteración del sistema inmune. Estos resultados sugieren que es necesario analizar con mayor detalle los efectos y mecanismos subyacentes del tratamiento con rifaximina para controlar o evitar posibles efectos secundarios nocivos.

1.2 Deterioro cognitivo. Alteraciones en hipocampo

La tabla 13 resume las alteraciones cognitivas y en la neurotransmisión y la neuroinflamación en hipocampo de ratas con daño hepático progresivo.

Tabla 13. Alteraciones cognitivas y en neuroinflamación y neurotransmisión en hipocampo de ratas con daño hepático progresivo

	Esteatohepatitis		Esteatohepatitis avanzada		Cirrosis	
	Efecto daño hepático	Efecto rifaximina	Efecto daño hepático	Efecto rifaximina	Efecto daño hepático	Efecto rifaximina
Memoria de reconocimiento de una nueva localización	↓	N	↓	N	↓	no normaliza
Memoria de reconocimiento de un nuevo objeto	no se altera		no se altera		↓	N
Índice de aprendizaje	↓	N	↓	N	no analizado	
Memoria de referencia	no se altera		↓	N	no analizado	
Memoria de trabajo	no se altera		↓	N	no analizado	
Expresión en membrana GluA1	no se altera		↑	no normaliza	↑	no normaliza
Expresión en membrana GluA2	↑	no normaliza	no se altera		↑	N
Expresión en membrana NR1	↓	N	no se altera		↓	no normaliza
Expresión en membrana NR2A	↓	N	↓	N	no se altera	
Expresión en membrana NR2B	no se altera		no se altera		no se altera	
Expresión en membrana GABA _A α1	no se altera		↓	N	↑	no normaliza
Expresión en membrana GABA _A α5	no se altera		↓	no normaliza	↓	no normaliza
Activación de microglía	↑	N	↑	N	↑	no normaliza
Activación de astrocitos	↑	no normaliza	↑	N	↑	N
IL-1β	↑	no normaliza	↑	N	↑	N
TNFα	↑	N	↑	N	↑	no normaliza

↑ = aumentado en daño hepático; ↓ = disminuido en daño hepático; N = normalización por la rifaximina

La tabla 14 resume los efectos de la rifaximina sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión en hipocampo de ratas control.

Tabla 14. Efectos de la rifaximina sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión en hipocampo de ratas control

	Esteatohepatitis	Esteatohepatitis avanzada	Cirrosis
Expresión en membrana GluA2	↑	no se altera	no se altera
Expresión en membrana NR1	↑	↑	no se altera
Expresión en membrana NR2A	no se altera	↑	no se altera
Expresión en membrana GABA _A α1	↑	no se altera	no se altera
Expresión en membrana GABA _A α5	no se altera	no se altera	↓
Activación microglía	↓	no se altera	no se altera
Activación astrocitos	no se altera	↑	↓
IL-1β	↑	no se altera	no se altera
TNFα	no se altera	no se altera	↑

↑ = aumentado en ratas control tratadas con rifaximina; ↓ = disminuido en ratas control tratadas con rifaximina.

Las ratas con esteatohepatitis presentan un deterioro de la memoria de reconocimiento de una nueva localización y del índice de aprendizaje en el laberinto radial, con un ligero aumento del número de errores de referencia respecto a las ratas control, mientras que no están afectadas la memoria de trabajo y de reconocimiento de un objeto nuevo.

El aprendizaje y la memoria espaciales se modulan en gran parte por el hipocampo (O'Keefe and Nadel, 1978; Morris et al., 1982). El hipocampo está implicado en la memoria de reconocimiento asociada al procesamiento de información espacial (Mumby et al., 2002; Barker and Warburton, 2011) y otros procesos cognitivos como la memoria de reconocimiento de objetos (Broadbent et al., 2004; Hammond et al., 2004) y la memoria de trabajo (Siapas et al., 2005; Hyman et al., 2010; Yoon et al., 2015). En ratas con fallo hepático o hiperamonemia el deterioro del aprendizaje y memoria espaciales se asocian a la alteración de la expresión en membrana en hipocampo de los receptores AMPA, NMDA y GABA_A inducida por la neuroinflamación (Hernández-Rabaza et al., 2015, 2016a; CabreraPastor et al., 2016a; Taoro-González et al., 2019).

Por lo tanto, analizamos si en las ratas con esteatohepatitis la alteración de la memoria de reconocimiento de lugar y el índice de aprendizaje espacial se asocian a las mismas alteraciones. Las ratas con esteatohepatitis muestran un aumento en hipocampo de la

expresión en membrana de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA y una disminución de las subunidades NR1 y NR2A de los receptores NMDA. La potenciación a largo plazo (LTP) es esencial para el aprendizaje y la memoria espaciales, y se modula por los receptores AMPA y NMDA (Morris y Frey, 1997). La LTP se altera en ratas PCS (Monfort et al., 2007). En ratas con esteatohepatitis la alteración de la expresión en membrana de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA induciría un deterioro de la LTP, lo que deterioraría el aprendizaje y la memoria espaciales. La activación de los receptores AMPA conduce a la entrada en la neurona post-sináptica de Na^+ y Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} no ocurre en los receptores que contienen la subunidad GluA2 (Geiger et al., 1995). Por lo tanto, el aumento de su expresión en membrana llevaría a la alteración de la señalización intracelular, que contribuiría al deterioro del aprendizaje y la memoria espaciales en ratas con esteatohepatitis. Estos resultados son similares a los descritos en ratas PCS, que también presentan un aumento en hipocampo de la expresión en membrana de GluA2 y una disminución de NR1 y NR2A, que se asocian al deterioro del aprendizaje y de la memoria espaciales en el laberinto acuático de Morris (Hernández-Rabaza et al., 2015). Puesto que las alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica en hipocampo se instauran como consecuencia de la neuroinflamación, analizamos si en ratas con esteatohepatitis se observa ya neuroinflamación en el hipocampo. En el hipocampo de ratas con esteatohepatitis se observa activación de microglía y astrocitos y aumento de los niveles de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Se ha demostrado en ratas hiperamonémicas que el aumento de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Hernández-Rabaza et al., 2016a), contribuye a la disminución del índice de aprendizaje en el laberinto radial. Existen evidencias de que determinadas citocinas están implicadas en algunas alteraciones cognitivas y no en otras. En ratas hiperamonémicas el aumento de $\text{TNF}\alpha$ induce alteraciones en el aprendizaje y la memoria de referencia espaciales, mientras que el aumento de $\text{IL-1}\beta$ altera la memoria de trabajo (Cabrera-Pastor et al., 2016a). Por tanto, el aumento de $\text{TNF}\alpha$ en hipocampo de ratas con esteatohepatitis contribuiría a la disminución del índice de aprendizaje. Sin embargo, el aumento de $\text{IL-1}\beta$ no es suficiente para alterar la memoria de trabajo en ratas con esteatohepatitis.

Taoro-González et al. (2019) han demostrado que la $\text{IL-1}\beta$ está involucrada en el deterioro de la memoria no espacial inducido por la neuroinflamación, mientras que el deterioro de la memoria de reconocimiento espacial es independiente de $\text{IL-1}\beta$ y está mediado por otros factores proinflamatorios. En nuestro caso, el aumento de $\text{IL-1}\beta$ en

hipocampo tampoco es suficiente para alterar la memoria de reconocimiento de objeto nuevo, no espacial, en ratas con esteatohepatitis, sugiriendo que son necesarios más factores, además del aumento de IL-1 β , o un aumento mayor de IL-1 β .

Uno de los factores asociados al aumento de IL-1 β en hipocampo es el aumento de la expresión en membrana de NR2B inducida por la activación del receptor de IL-1 β (Taoro-González et al, 2018). Sin embargo, en ratas con esteatohepatitis, no está alterada la expresión en membrana de NR2B, posiblemente porque el aumento de IL-1 β no es suficientemente alto. Esto podría ser la causa de que no se altere la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo. Además, el aumento de NR2B induce aumento de la expresión en membrana de GluA2 y disminución de GluA1. En las ratas con esteatohepatitis, aunque está aumentado GluA2 (a pesar de no alterarse NR2B, lo cual indica que en este caso se debe activar un paso posterior de la vía que aumenta GluA2 en la membrana por otro mecanismo paralelo, independiente de NR2B) no está disminuido GluA1 y esto también podría contribuir a que no se altere la memoria de reconocimiento de objeto nuevo.

En ratas con esteatohepatitis, el tratamiento con rifaximina no normaliza la expresión en membrana de GluA2, pero previene la disminución de la expresión en membrana de NR1 y NR2A. Los receptores NMDA están implicados en la modulación del aprendizaje y de la memoria espacial. Se ha observado en modelos de rata con demencia vascular que la estimulación magnética transcraneal repetitiva mejora el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica, y esto se asocia con aumento de la expresión de NR1 en hipocampo (Zhang et al., 2015b). Además, ratones transgénicos que carecen de NR1 en CA1 muestran deterioro del aprendizaje espacial y de la memoria evaluados en el laberinto acuático de Morris (Tsien et al., 1996). También se ha visto que en animales con déficits cognitivos inducidos por la exposición a Pb²⁺ el deterioro del aprendizaje espacial y de la LTP en hipocampo se asocia a una disminución de la expresión de NR1 y NR2A en todo el hipocampo, mientras que se observa un pequeño aumento de la expresión de NR2B en CA3 (Nihei y Guilarte, 2001). Estos datos indican que la rifaximina podría estar previniendo el deterioro en la memoria y el aprendizaje espacial a través de la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica, en particular a través de la normalización de la expresión en membrana de las subunidades NR1 y NR2A del receptor NMDA, que parecen jugar un papel más importante que GluA2 en estas condiciones.

En ratas con esteatohepatitis la rifaximina previene la activación de la microglía pero no la de los astrocitos, y disminuye los niveles de $\text{TNF}\alpha$ pero no los de $\text{IL-1}\beta$. La disminución de $\text{TNF}\alpha$ sería suficiente para prevenir el deterioro de la memoria de reconocimiento de una nueva localización y del índice de aprendizaje en el laberinto radial, apoyando el hecho de que la $\text{IL-1}\beta$ no tiene un papel importante en la modulación de la memoria y aprendizaje espaciales. Nuestros resultados apoyan que los mecanismos implicados en el deterioro del aprendizaje y memoria espaciales están modulados por el $\text{TNF}\alpha$ liberado por la microglía, y por su modulación de la neurotransmisión glutamatérgica a través de los receptores NMDA.

Las ratas con esteatohepatitis avanzada siguen presentando disminución de la capacidad de aprendizaje y alteración de la memoria de reconocimiento de una nueva localización, pero presentan además deterioro de la memoria de trabajo y de referencia en el laberinto radial. En el hipocampo de estas ratas la expresión en membrana de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA se ve normalizada, mientras que aumenta la de la subunidad GluA1. Con respecto a los receptores NMDA la expresión en membrana de NR2A sigue disminuida, pero la de NR1 ya no. Además, la expresión en membrana de las subunidades alfa 1 y alfa 5 de los receptores GABA_A , que no se altera en esteatohepatitis, está disminuida. La subunidad GluA1 es esencial para el aprendizaje espacial (Sanderson et al., 2008). En ratas con hiperamonemia crónica las alteraciones de la memoria de trabajo y de la memoria de referencia se asocian a aumento de la expresión en membrana en hipocampo de GluA1 (Cabrera-Pastor et al., 2016a) y a una disminución de $\text{GABA}_A\alpha 1$ y de NR2A (Taoro-Gonzalez et al., 2019). Nuestros resultados sugieren que el aumento de GluA1 y disminución de $\text{GABA}_A\alpha 1$, que no estaban alterados en esteatohepatitis, como tampoco la memoria de trabajo, serían los que contribuirían a que se altere la memoria de trabajo en ratas con esteatohepatitis avanzada, tras 7 semanas de administración de CCl_4 . La disminución de NR2A debe contribuir al deterioro del aprendizaje espacial en el laberinto radial en ratas con esteatohepatitis de distintos grados.

En el estadio de esteatohepatitis avanzada persisten la activación de microglía y astrocitos y el aumento de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, que deben causar las alteraciones en la expresión en membrana de los receptores de glutamato y GABA, implicadas en el deterioro de la memoria de referencia y de trabajo en el laberinto radial.

En ratas con esteatohepatitis avanzada la rifaximina sigue previniendo el aumento de TNF α y la disminución de la expresión en membrana de NR2A, previniendo la alteración del aprendizaje y de la memoria de reconocimiento de una nueva localización y del aprendizaje espacial en el laberinto radial. Además, en este estadio la rifaximina revierte la activación de los astrocitos, el aumento de IL-1 β y la disminución de la expresión en membrana de GABA α 1, previniendo así el deterioro de la memoria de trabajo en el laberinto radial y sugiriendo que el receptor GABA α 1 tiene un papel más relevante en la modulación de la memoria de trabajo que el aumento de GluA1, que sigue alterado en ratas tratadas con rifaximina.

La memoria de reconocimiento de un nuevo objeto, que no se altera en esteatohepatitis, se ve afectada en ratas cirróticas, que además siguen mostrando alteración de la memoria de reconocimiento de una nueva localización. En el hipocampo de estas ratas la expresión en membrana de GluA1 sigue aumentada, y también vuelve a aumentar la de GluA2. La expresión en membrana de NR2A se normaliza, mientras que la de NR1 vuelve a estar disminuida. La expresión en membrana de GABA α 5 sigue disminuida, y la de GABA α 1 está aumentada. En ratas PCS el aumento en hipocampo de la expresión en membrana de GABA α 1 también se asocia a la alteración del aprendizaje y de la memoria espaciales (Hernández-Rabaza et al., 2015). Nuestros datos sugieren que el aumento de GABA α 1 en la membrana puede estar relacionado con la alteración de la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo, ya que es el único elemento que solamente se produce en ratas cirróticas y no en ratas con menor grado de daño hepático. Aun así, no podemos descartar la contribución de otras subunidades de receptores que no hemos analizado en este trabajo o la contribución de otras áreas cerebrales, como la corteza perirrinal, como se describe en Taoro-González et al. (2019), donde se demuestra que la activación de microglía y aumento de IL-1 β en la corteza perirrinal contribuye a la alteración de la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo. Estudios en sujetos con daño cerebral permanente han revelado la importancia de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento de objetos a través de la neurotransmisión glutamatérgica (Winters y Bussey, 2005). El bloqueo de los receptores NMDA deteriora la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo a corto y a largo plazo, y eso indica que estos receptores son necesarios para la formación de la memoria de reconocimiento de objetos (de Lima et al., 2005). El mismo efecto se observa tras el bloqueo de la LTP mediante inyección intra-hipocampal de antagonistas

de los NMDA, lo que altera la plasticidad sináptica (Baker y Kim, 2002). Además, en la corteza perirrinal se expresan varias subunidades de los receptores GABA_A (Pirker et al. 2000), y eso sugiere que la neurotransmisión GABAérgica también podría estar implicada en la formación de la memoria de reconocimiento de un nuevo objeto. En un modelo de rata de esquizofrenia la administración intra-hipocampal de un antagonista selectivo de los receptores GABA_A deteriora la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo (Damgaard et al., 2011; Riordan et al., 2018). Kim et al. (2014) demostraron que la inyección intra-perirrinal en ratas de bicuculina, un antagonista del receptor GABA_A, aumenta el tiempo de exploración en el test de reconocimiento de un objeto nuevo, mientras que la inyección intra-hipocampal lo disminuye. Estos resultados indican que en la formación de la memoria de reconocimiento de objetos participan la corteza perirrinal y los receptores GABA_A. En el estadio de cirrosis siguen la activación de microglía y astrocitos y el aumento de TNF α y IL-1 β , los cuales deben participar en la alteración de la expresión en membrana de las subunidades de receptores GABA y de glutamato.

Una observación que se desprende también de estos resultados es que tanto el aumento como la disminución en la expresión en membrana de ciertas subunidades de receptores, como GABA_A α 1, puede asociarse a alteraciones cognitivas y por tanto debe ser primordial mantener un nivel adecuado de expresión de las subunidades de los receptores de neurotransmisores, sugiriendo que su expresión en membrana debe estar altamente regulada.

En ratas cirróticas el tratamiento con rifaximina no revierte la disminución de la expresión en membrana de NR1 ni de GABA_A α 5, ni el aumento de GABA_A α 1 o GluA1, aunque sí el aumento de GluA2, lo cual debe estar involucrado y ser suficiente para la prevención del deterioro de la memoria de reconocimiento de una nueva localización. El aumento de TNF α y la activación de microglía tampoco se previenen totalmente con rifaximina en las ratas cirróticas, pero sí el aumento de IL-1 β y la activación de astrocitos, lo cual corrobora el papel de IL-1 β en el deterioro de la memoria de reconocimiento de objetos nuevos.

La rifaximina también ha mostrado tener algunos efectos en el hipocampo de ratas control. Tras dos semanas de tratamiento diario con rifaximina se observa activación de microglía, así como aumento de la expresión de IL-1 β y de la expresión en membrana de GluA2, NR1 y GABA_A α 1, y una disminución de la memoria de localización de

objetos, aunque no llega a ser estadísticamente significativa. Tras 6 semanas de tratamiento con rifaximina en ratas control se observa un aumento de la activación de los astrocitos y un aumento de la expresión en membrana de NR1 y NR2A. A las 10 semanas de administración de rifaximina hay un aumento de TNF- α en las ratas control y una disminución de la expresión en membrana de GABA α 5. Además, tras 10 semanas de tratamiento, la rifaximina produce una disminución significativa del contenido de GFAP, que puede deberse a la inhibición de la proliferación de astrocitos o a un aumento de su muerte.

La rifaximina, a través de su efecto sobre la función de la microbiota intestinal, altera el sistema inmune (Ma et al., 2007; Cheng et al., 2010; Mencarelli et al., 2010; Mencarelli et al., 2011; Hirota, 2015). Por ello, también en ratas control puede llegar a producir neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión, aunque no hemos llegado a observar alteraciones cognitivas significativas en ratas control tratadas con rifaximina.

Esto sugiere que deben coincidir diferentes factores pro-inflamatorios y alteraciones en la neurotransmisión para inducir alteraciones cognitivas significativas, mientras que en ocasiones, la normalización o prevención de una sola o pocas de las alteraciones estudiadas es suficiente para que la rifaximina mejore significativamente la alteración cognitiva. También podría ocurrir que a la mejoría inducida por rifaximina en las ratas con fallo hepático contribuyan otros factores que no hemos analizado.

Las alteraciones inducidas por la rifaximina sobre la microbiota intestinal, y por lo tanto sobre el sistema inmune, pueden tener efectos beneficiosos en ratas con daño hepático previo, ya sujetas a alteración de la microbiota (Bajaj et al. 2018, Milosevic et al. 2019; Liu et al. 2020), y que ya presentan inflamación y neuroinflamación, pero efectos nocivos en ratas sanas.

Nuestros resultados sugieren, en general, que la rifaximina produce efectos por sí misma en ratas control que suelen ser transitorios, lo cual puede deberse a que su efecto sobre la composición o función de la microbiota intestinal evoluciona y cambia con el tiempo de tratamiento. Los efectos deberían ir cambiando conforme cambia la microbiota presente en cada momento. También es posible que en el cerebro ocurran mecanismos adaptativos para combatir los cambios inducidos por la rifaximina.

2. Papel de la inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación

Una vez que hemos constatado y caracterizado las alteraciones cognitivas y motoras en ratas con distinto grado de daño hepático, así como las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica asociadas, en hipocampo y cerebelo, y hemos caracterizado la neuroinflamación en estas dos áreas cerebrales, el siguiente objetivo de este trabajo fue determinar cómo se induce la neuroinflamación en los diferentes grados de daño hepático.

Partiendo del hecho de que tanto la hiperamonemia como la inflamación periférica contribuyen al desarrollo de la neuroinflamación, se analizó la hiperamonemia en sangre. Se ha demostrado que la hiperamonemia per se es capaz de inducir inflamación periférica (Balzano et al., 2020). Estas ratas presentan hiperamonemia a partir de la sexta semana de inyección de CCl₄, indicando que la neuroinflamación precede a la aparición de hiperamonemia. Por tanto, analizamos la inflamación periférica, que sería la principal inductora de neuroinflamación en ratas con esteatohepatitis. La aparición de hiperamonemia a partir de la sexta semana de CCl₄ (esteatohepatitis intermedia) podría contribuir a la evolución de los efectos observados en cerebelo e hipocampo. Está bien establecido que la hiperamonemia crónica per se es suficiente para inducir neuroinflamación y deterioro neurológico (Rodrigo et al., 2010; Hernández-Rabaza et al., 2016a).

2.1 Cambios en citocinas periféricas asociadas al daño hepático

Durante las dos primeras semanas de insuficiencia hepática, las ratas con esteatohepatitis leve muestran un aumento de las citocinas proinflamatorias IFN γ , TNF α , IL-6 e IL-15 (fase aguda temprana) y más tarde también un aumento de IL-17 (fase aguda tardía). Estos cambios concuerdan con los observados en pacientes con esteatohepatitis (Tilg y Diehl, 2000). A las 4 semanas los niveles de TNF α siguen aumentados, pero también se observa un aumento de las citocinas antiinflamatorias IL-4 y TGF β y una disminución de IL-10. Todos estos factores están involucrados en mecanismos destinados a suprimir la síntesis de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas (Tilg y Diehl, 2000). A las 8 semanas siguen aumentados los niveles de IL-15, y a las 12 semanas se sigue observando el aumento de IFN γ , TNF α , IL-17 y TGF β y la disminución de IL-10. Estas fluctuaciones en los niveles plasmáticos de citocinas

podrían ser debidos a un proceso adaptativo, por el cual el organismo se adapta a la inflamación a la semana 4 pero a medida que el daño hepático avanza la respuesta pro-inflamatoria vuelve a superar a la respuesta anti-inflamatoria. Otro factor que puede contribuir a los cambios en citocinas es la aparición de la hiperamonemia a partir de 6 semanas.

Junto con las citocinas pro- o anti- inflamatorias, también se expresan otro tipo de citocinas cuya función es atraer a diferentes tipos de células del sistema inmune, son las quimiocinas o moléculas quimioatrayentes. El daño hepático induce un rápido aumento, a las dos semanas, de las quimiocinas CCL20 y CX3CL1, que también aumentan en pacientes cirróticos con EHM. Sin embargo, en las ratas inyectadas con CCl₄ los niveles de estas quimiocinas evolucionan con el tiempo, como ocurre con las otras citocinas. De hecho, a las 4 semanas CCL20 no está aumentada, pero vuelve a aumentar en ratas con esteatohepatitis avanzada y se mantiene aumentada en ratas cirróticas, mientras que CX3CL1 ya no está aumentado en ratas con esteatohepatitis avanzada o cirróticas. Así, el aumento de CCL20 reproduce lo que ocurre en pacientes cirróticos con EHM, mientras que en las ratas con cirrosis inducida por inyección crónica de CCl₄ algún mecanismo diferente impide que se mantenga aumentada CX3CL1, al contrario que en pacientes cirróticos con EHM.

Tras solo una semana de tratamiento con rifaximina, ésta es capaz de prevenir el aumento de TNF α y de IL-15, pero no el de IL-17 indicando que previene algunos cambios en la inflamación periférica pero no otros. Dos semanas de tratamiento con rifaximina previenen el aumento de IL-4 y también reducen el aumento de TNF α pero no afectan a la disminución de IL-10, sugiriendo de nuevo que los efectos de la rifaximina son específicos sobre algunas citocinas, no es un efecto general sobre la inflamación periférica inducida por el daño hepático. Sin embargo, un tratamiento más prolongado con rifaximina ya no previene el aumento de IL-15 ni el de TNF α en ratas cirróticas, lo cual explicaría que algunas alteraciones cerebrales no se prevengan con rifaximina en ratas con cirrosis hepática. Esto puede deberse a que hay una adaptación a los efectos de la rifaximina o bien que el daño hepático es más importante y esta dosis de rifaximina ya no es suficiente para contrarrestar el aumento de algunas citocinas proinflamatorias.

En ratas control dos semanas de tratamiento con rifaximina aumentan los niveles plasmáticos de TGF β . Tras 10 semanas de tratamiento la rifaximina induce cierto

aumento de TNF α y de CCL20, aunque no significativos. Otro efecto observado en ratas control es un aumento transitorio de la hiperamonemia, tras 4 semanas de tratamiento con rifaximina. Ambos efectos serían debidos posiblemente a la alteración de la composición de la microbiota en cuanto al contenido o función de microorganismos que metabolizan el nitrógeno y al efecto de los metabolitos producidos por la microbiota sobre el sistema inmune.

2.2 Alteraciones en el inmunofenotipo asociadas al daño hepático

Los cambios en los niveles de citocinas se asocian a cambios en el inmunofenotipo, que se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Cambios en el inmunofenotipo en ratas con daño hepático progresivo

	Esteatohepatitis leve	Esteatohepatitis	Esteatohepatitis avanzada	Cirrosis
CD4 ⁺	↓	no se altera	no se altera	no se altera
CD8 ⁺	↑	no se altera	no se altera	no se altera
CD4 ⁺ <i>naïve</i>	↑	↓ N	↓ N	↓
CD4 ⁺ de memoria	↓	↑ N	↑ N	↑ N
C8 ⁺ <i>naïve</i>	↑	↓ N	↓ N	no se altera
CD8 ⁺ de memoria	↓	↑ N	↑ N	↑ N
CD4 ⁺ reguladoras	no se altera	↑ N	↑ N	↑ N
CD8 ⁺ reguladoras	↓	↑ N	no se altera	↑
CD4 ⁺ autorreactivas	↑	no se altera	↑ N	↑
CD8 ⁺ autorreactivas	no se altera	no se altera	↑ N	↑ N
Linfocitos B	↓	↑ N	no se altera	no se altera
Monocitos activados	no se altera	no se altera	↑ N	↑ N

↑ = aumentado en CCl₄; ↓ = disminuido en ratas CCl₄; N = normalización por la rifaximina

Las ratas con esteatohepatitis leve (2 semanas de CCl₄) presentan en sangre periférica disminución de los linfocitos T CD4⁺ y de los linfocitos B, y aumento de los linfocitos T CD8⁺. Estas ratas también tienen disminuidas las células de memoria tanto CD4⁺ como CD8⁺.

La migración de linfocitos hacia el intestino en condiciones de homeostasis ha sido descrita hace décadas (Cahill et al., 1977; McDermott y Bienenstock, 1979; Smith et al., 1970), y los mecanismos subyacentes a este fenómeno han sido esclarecidos desde el descubrimiento de moléculas de adhesión y citocinas implicadas en el reclutamiento de estas células inmunes en el intestino (Streeter et al., 1988; Shaw et al., 1995; Butcher et al., 1999). Se ha descrito que algunas quimiocinas también desempeñan un papel importante en el reclutamiento y localización de linfocitos en el intestino (Luster, 2001;

Papadakis y Targan, 2000; Yoshie et al., 2001). Las células del sistema inmune que pueden migrar hacia el intestino incluyen linfocitos T y B, tanto de memoria como efectores (Kunkel y Butcher, 2002; Kunkel et al., 2010). En pacientes con NASH el fallo hepático y la consecuente inflamación periférica inducen permeabilización de la barrera intestinal (Wigg et al., 2001; Luther et al., 2015; Ray, 2015). Además, el hígado está constantemente expuesto a productos de bacterias comensales (residentes fisiológicamente en el intestino) con potencial inflamatorio. La disbiosis intestinal conduce a inflamación patológica crónica del hígado (Robinson et al., 2016) y aumento de la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas, permitiendo la atracción de linfocitos hacia el hígado (Lalor et al., 2002). Es decir, el daño hepático permeabiliza la barrera intestinal y esto a su vez contribuye a aumentar la inflamación hepática. Estas observaciones avalan la hipótesis de que las poblaciones linfocitarias que aparecen disminuidas en plasma de ratas con esteatohepatitis leve podrían haber abandonado el torrente sanguíneo para infiltrar primero el intestino y en un segundo momento el hígado. Por otro lado, una linfopenia temprana se ha asociado con esteatosis (Loof et al., 2018). Esta linfopenia podría ser consecuencia de la infiltración en intestino.

Las células citotóxicas CD8⁺ involucradas en la respuesta inmune celular secretan grandes cantidades de IFN γ y TNF α (Murata et al., 2002), por lo que su aumento sería responsable del aumento inicial de estas citocinas proinflamatorias en las ratas inyectadas con CCl₄. Los niveles de linfocitos T CD8⁺ también están aumentados en la sangre periférica de pacientes con hepatitis C crónica y este aumento se asocia a la inducción de daño hepático (Murata et al., 2002).

Conforme progresa el daño hepático los niveles periféricos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se normalizan, indicando que su alteración es solo parte de la respuesta inicial al daño hepático, pero después los niveles plasmáticos ya no están alterados, sugiriendo que se produce una cierta adaptación en el sistema inmune periférico.

Los niveles de linfocitos CD4⁺CD28⁻ autorreactivos están sujetos a variaciones conforme progresa el daño hepático en las ratas inyectadas con CCl₄. La pérdida de la molécula coestimuladora CD28 en los linfocitos CD4⁺ es consecuencia de una activación inmune persistente. La exposición prolongada a TNF α reduce la expresión de CD28 en las células T al reducir su transcripción (Lewis et al., 2004). Esto sugiere que el aumento prolongado de TNF α contribuye al aumento de los niveles de linfocitos autorreactivos CD4⁺CD28⁻. Por otro lado, las células T reguladoras CD8⁺FoxP3⁺

inhiben la proliferación de células $CD4^+CD28^-$ y la secreción de $IFN\gamma$ e IL-17 (Correale et al., 2010; Cao et al., 2016). A las 2 semanas de insuficiencia hepática, la cantidad de células T reguladoras $CD8^+FoxP3^+$ en sangre se reduce, lo que contribuye a la proliferación y el aumento de las células autorreactivas $CD4^+CD28^-$, que producen $IFN\gamma$ e IL-17. A las 4 semanas de insuficiencia hepática la cantidad de células T reguladoras $CD8^+FoxP3^+$ aumenta y suprime la proliferación de células autorreactivas $CD4^+CD28^-$, que vuelven a los niveles normales a las 4 semanas, junto con los de $IFN\gamma$ e IL-17. En el estadio de esteatohepatitis también se observa un aumento de las células T reguladoras $CD8^+FoxP3^+$. A las 8 semanas de insuficiencia hepática los niveles de las células $CD8^+FoxP3^+$ vuelven a valores normales, y esto permite que las células autorreactivas $CD4^+CD28^-$ vuelvan a proliferar. Tras 12 semanas de insuficiencia hepática, a pesar del aumento de las células T reguladoras $CD8^+FoxP3^+$, también siguen aumentadas las células autorreactivas $CD4^+CD28^-$, con el consecuente aumento de $IFN\gamma$ e IL-17. Esto sugiere que la activación de las células $CD4^+CD28^-$ por parte del $TNF\alpha$ persiste mientras avanza el daño hepático, y que la acción supresora de las células reguladoras $CD8^+FoxP3^+$ es insuficiente para contrarrestar su proliferación.

En ratas con esteatohepatitis las células T reguladoras $CD4^+$ están aumentadas. El $TGF\beta$ es un potente inductor de la expresión de FoxP3 y de la función de las células T reguladoras (Chen et al., 2003). Andersson et al. (2008) han demostrado que las células T reguladoras $CD4^+$ inducen la diferenciación de otras de células T reguladoras $CD4^+$ a partir de precursores T *naïve*, de una manera dependiente de $TGF-\beta$, generando así tolerancia infecciosa. En ratas con esteatohepatitis los niveles de $TGF-\beta$ aumentan, estimulando la diferenciación de células T *naïve* a células T reguladoras $CD4^+$ mediante la inducción de la transcripción de FoxP3. A 8 y 12 semanas de insuficiencia hepática los niveles de T reguladoras $CD4^+$ siguen aumentados, llevando a una ulterior producción de $TGF-\beta$, cuyos valores volverán a estar aumentados en ratas cirróticas.

La población de células T $CD8^+CD28^-$ se encuentra aumentada en ratas con esteatohepatitis avanzada. Se han descrito alteraciones en los niveles de células T $CD8^+CD28^-$ en cáncer, infecciones virales, autoinmunidad y casi todas las enfermedades inflamatorias crónicas (Strioga et al., 2011; Arosa et al., 2017). Se trata de una población de células reguladoras que ejerce efectos directos sobre las células T $CD4^+$, inhibiendo su activación y proliferación y disminuyendo la secreción de citocinas

pro-inflamatorias (Liu et al., 2015; Reiser y Banerjee, 2016). No obstante, en algunas patologías, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la artritis reumatoide, las células T $CD8^+CD28^-$ expresan niveles aumentados de mediadores citotóxicos, como perforina y granzima B, y de citocinas pro-inflamatorias, como $IFN-\gamma$ y $TNF\alpha$ (Hodge y Hodge, 2016). Estas células autorreactivas podrían por lo tanto ser las responsables o al menos contribuir al aumento de los niveles de $IFN-\gamma$ y $TNF\alpha$ en la enfermedad hepática avanzada. En el estadio de cirrosis las células autorreactivas $CD8^+CD28^-$ siguen aumentadas, contribuyendo al aumento de los niveles periféricos de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$.

En ratas con esteatohepatitis los niveles de células T de memoria, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$, aparecen aumentados. Las células T *naïve* $CD4^+$ o $CD8^+$ se activan tras la exposición a un determinado antígeno, y posteriormente experimentan expansión proliferativa y diferenciación a células T efectoras. Estas poblaciones de células T efectoras activadas contienen los precursores de las células T de memoria de larga duración específicos para un antígeno, que persisten *in vivo* como poblaciones heterogéneas en múltiples sitios, y pueden coordinar respuestas inmunes protectoras tras una nueva exposición al patógeno (Farber et al., 2014). Por tanto, el aumento de las células T de memoria indica una activación del sistema inmune. Se ha descrito la presencia de células T de memoria $CD4^+$ "multipotentes", capaces de producir una gran variedad de citocinas, entre ellas $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$, a niveles más altos que las células productoras de citocinas específicas (MacLeod et al., 2009). El aumento de las células T de memoria $CD4^+$ tras 4 semanas de inducción del daño hepático podría por tanto contribuir al aumento de los niveles periféricos de $TNF\alpha$. La producción de IL-15 es necesaria para la proliferación y la supervivencia de las células T de memoria $CD4^+$ y $CD8^+$ (Kim y Harty, 2014; Raeber et al., 2018). El aumento periférico de esta citocina a 1 y 2 semanas de inyección de CCl_4 podría contribuir a la maduración y la proliferación de las células T de memoria, cuyos valores aumentan a la semana 4. En ratas con esteatohepatitis avanzada los niveles de células T de memoria siguen aumentados, y también vuelven a aumentar los de IL-15, favoreciendo su proliferación y diferenciación. En ratas cirróticas las células T de memoria siguen estando aumentadas, y esto se asocia a la producción de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$. Su proliferación en esta etapa de daño hepático estaría favorecida por el aumento de los niveles periféricos de IL-17.

En ratas con esteatohepatitis, a la semana 4, también están aumentados los niveles de linfocitos B. Se ha descrito que el TNF α secretado por las células T, en combinación con la IL-4, favorece la proliferación de los linfocitos B (Elgueta et al., 2009). Ambas citocinas aparecen aumentadas en estas ratas, por lo que podrían ser las inductoras de la proliferación de las células B.

A partir de las 8 semanas también se observa aumento del número de los monocitos activados. La insuficiencia hepática crónica se asocia a hipertensión portal, y esta alteración se reproduce en ratas con daño hepático crónico inducido por CCl₄ (Zhang et al., 2016). Se ha demostrado que la hipertensión portal induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF α por los monocitos activados en sangre periférica (Pérez del Pulgar et al., 2000; McClain y Cohen, 1989). En pacientes con cirrosis alcohólica los monocitos de la sangre periférica presentan una secreción disminuida de IL-10, que podría desempeñar un papel importante en la activación de monocitos y el aumento de la producción de TNF α observada en la enfermedad hepática alcohólica (así como en la respuesta fibrótica hepática en estos pacientes) (Le Moine et al., 1995).

La quimiocina CX3CL1 está implicada en el reclutamiento de linfocitos T y B, células NK y monocitos (Ferretti et al., 2014). En ratas con esteatohepatitis avanzada la activación de los monocitos contribuiría al aumento de TNF α y estaría asociada al aumento de los niveles de CX3CL1. Una vez activados, los monocitos proliferan y en ratas cirróticas podrían contribuir a la disminución del contenido de IL-10 y al aumento del TNF α .

El tratamiento con rifaximina previene muchas de las alteraciones en los niveles plasmáticos de citocinas, previniendo la activación del sistema inmune y el consecuente aumento de los linfocitos T de memoria.

La rifaximina previene el aumento de los linfocitos T reguladores CD4⁺FoxP3⁺ y el aumento del TGF β periférico. También normaliza los niveles de TNF α en sangre, y eso puede contribuir a la normalización por la rifaximina de los niveles de linfocitos CD4⁺CD28⁻ en ratas con fallo hepático. En ratas con esteatohepatitis, la rifaximina normaliza los cambios en las células T reguladoras CD8⁺FoxP3⁺ y en las células autorreactivas CD4⁺CD28⁻, lo que puede contribuir a prevenir el aumento de TNF α en sangre.

Sin embargo, en ratas con cirrosis, la rifaximina no es capaz de normalizar los niveles de linfocitos $CD4^+CD28^-$ y $CD8^+FoxP3^+$. El tratamiento con rifaximina normaliza los niveles de células T $CD8^+CD28^-$, normalizando los niveles de $IFN-\gamma$, pero no tiene efecto sobre los niveles de $TNF\alpha$. Estos datos sugieren que en ratas cirróticas la producción de $IFN-\gamma$ estaría asociada a la expansión de los linfocitos T autorreactivos $CD8^+CD28^-$, mientras que la de $TNF\alpha$ dependería de otros mecanismos adicionales.

La rifaximina revierte la activación de los monocitos, que en ratas cirróticas se asocia a la normalización de los niveles de IL-10 pero no de $TNF\alpha$, cuyo aumento se debe no solo a los monocitos activados sino también a otras poblaciones de células inmunes, como las de memoria. El $TNF\alpha$ también se puede producir en tejidos y órganos.

A 12 semanas también se observa un aumento de los linfocitos T autorreactivos $CD8^+CD28^-$ en ratas control tratadas con rifaximina, que podría ser inducido por el aumento del $TNF\alpha$ periférico, aunque este último no llegue a ser significativo.

2.3 Infiltración de células del sistema inmune periférico en el SNC

Un mecanismo a través del cual la inflamación periférica transmite efectos al cerebro causando neuroinflamación es la infiltración de células del sistema inmune, frecuentemente asociado a la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE). El estrés inflamatorio inducido por IL-6, $TNF\alpha$ y/o IL-17 conduce a una pérdida de integridad de la BHE, con disminución de proteínas de unión estrecha como ocludina y ZO-1 (Ni et al., 2017; Voirin et al, 2020). Tras solo una semana de administración de CCl_4 se observa un rápido aumento de $TNF\alpha$ e IL-6 seguido de un aumento de IL-17 a las 2 semanas, lo que induciría la disminución de ocludina y ZO-1 observadas en cerebelo, conduciendo a la permeabilización de la BHE en ratas con esteatohepatitis leve, lo que facilitaría la infiltración de linfocitos $CD4^+$ y monocitos/macrófagos observada en ratas con esteatohepatitis, tanto en cerebelo como en hipocampo.

La prevención por la rifaximina de la mayoría de los cambios en la inflamación periférica explicaría por qué previene la reducción de ocludina y ZO-1 y la infiltración de linfocitos $CD4^+$ y macrófagos en cerebelo.

Sin embargo, en hipocampo la rifaximina solo es capaz de prevenir la infiltración de macrófagos, pero no la de linfocitos. Esto se asociaría a un menor efecto de la rifaximina sobre la neuroinflamación en hipocampo comparado con el cerebelo.

Además, sugiere que los mecanismos de infiltración y neuroinflamación en el hipocampo serían diferentes, al menos en parte, de los que se producen en el cerebelo.

La infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos T está promovida por citocinas que actúan como quimioatrayentes. CCL2 y CX3CL1 promueven el reclutamiento de monocitos periféricos (D' Mello et al., 2009; Ní Chasaide et al., 2020; Wolfe et al., 2018; Bajaj et al., 2013) y linfocitos T (Ní Chasaide et al., 2020; Cédile et al., 2017; Schulz et al., 2019). CCL20 promueve el reclutamiento de diferentes subtipos de linfocitos CD4⁺, incluidos Th1, Th17, autorreactivos y Tregs (Arima et al., 2012; Reboldi et al., 2009; Sallusto et al., 2012).

La IL-17 promueve la expresión de CCL2 (Du et al., 2020) y CCL20 (Chabaud et al., 2001) y la IL-15 es un potente quimioatrayente de células T que permite la infiltración de linfocitos en el cerebro (Petranovic et al., 2014).

A las 2 semanas de insuficiencia hepática, CCL20, CX3CL1, IL-15 e IL-17 aumentan en plasma, proporcionando un ambiente que promueve el reclutamiento de monocitos y linfocitos en el cerebro. A las 4 semanas, CX3CL1 e IL-15 permanecen aumentadas en plasma y, además, CCL2, CCL20 y CX3CL1 aumentan en cerebelo. Estos cambios, junto con la permeabilización de la BHE (reducción de ocludina y ZO-1), promoverían el reclutamiento y la infiltración de monocitos-macrófagos y linfocitos CD4 en cerebelo de ratas con esteatohepatitis.

En el hipocampo de ratas con esteatohepatitis también se ha observado la infiltración de monocitos-macrófagos y de linfocitos, así como un aumento de CCL2 y CCL20.

Una semana de tratamiento con rifaximina previene el aumento de CCL20 e IL-15, pero no de CX3CL1 e IL-17 en plasma. A las dos semanas de tratamiento con rifaximina se normalizan los niveles de CX3CL1 e IL-15 en plasma, y de CCL2, CCL20 y CX3CL1 en cerebelo. Esto contribuiría a prevenir la infiltración de células inmunes en cerebelo.

En hipocampo la rifaximina previene la infiltración de macrófagos, pero no de linfocitos T CD4⁺, y previene el aumento de CCL2 pero no de CCL20. Esto sugiere que la infiltración de linfocitos puede estar mediada por CCL20, siendo la rifaximina incapaz de prevenir estas alteraciones.

Los efectos de la rifaximina sobre la producción de quimiocinas serían los que conducirían a la prevención de la infiltración de monocitos y linfocitos en ratas con esteatohepatitis, y por tanto esto contribuirá a la reducción de la neuroinflamación por la rifaximina. Los resultados también sugieren que el tratamiento con rifaximina durante

una sola semana no es suficiente para prevenir algunos efectos, los cuales requieren un tratamiento más largo, de al menos dos semanas.

Por otra parte, como ocurre en plasma también en cerebelo e hipocampo de ratas control tratadas durante una o dos semanas con rifaximina se observa un aumento significativo de la quimiocina CCL2, sugiriendo que los efectos periféricos de la rifaximina deben transmitirse también al cerebro. Sin embargo, nuestros resultados actuales no permiten proponer de momento qué mecanismo debe mediar el aumento de CCL2 en hipocampo y cerebelo inducido por la rifaximina.

2.4 Activación de microglía

La activación de la microglía, tanto en cerebelo como en hipocampo, precede la infiltración de linfocitos y macrófagos y se observa ya a las 2 semanas de insuficiencia hepática. Un mecanismo general por el cual la inflamación periférica puede activar la microglía, independientemente de la infiltración de las células inmunes, es la activación por parte de las interleucinas periféricas (TNF α , IL-1 β , IL-6) de sus receptores en las células endoteliales, lo que desencadena la liberación de factores inflamatorios en el cerebro (Rummel et al., 2006). Es probable que este sea el mecanismo inicial por el cual la insuficiencia hepática desencadena la activación de la microglía. La infiltración posterior de macrófagos y linfocitos T potencia y mantiene una neuroinflamación sostenida en el cerebro de ratas con esteatohepatitis.

A pesar de la activación de microglía a las dos semanas de administración de CCl₄, no se observa aumento significativo de TNF α ni en cerebelo ni en hipocampo. Podría ser que en este momento la microglía activada produzca otras citocinas pro-inflamatorias como IFN γ , IL-17 o IL-6, las cuales inducirían la posterior activación de astrocitos y producción de TNF α por la microglía a 4 semanas, en ratas con esteatohepatitis.

Además, en el hipocampo se observa una disminución de los niveles de IL-1 β a las dos semanas. Esta disminución se observa en las neuronas. Se ha descrito un papel de la expresión constitutiva de IL-1 β en el aprendizaje y memoria espaciales, ya que el aumento del antagonista endógeno del receptor IL-1, IL1Ra, induce deterioro del aprendizaje y memoria espaciales (Avital, 2003; Goshen, 2007; Labrousse, 2009). Esta disminución de IL-1 β podría contribuir a la temprana (3 semanas) alteración de la memoria de localización de objetos. Sin embargo, no sabemos por qué mecanismo podría disminuir la expresión constitutiva de IL-1 β .

La activación inicial de la microglía puede inducir la expresión de quimiocinas como CCL2, CCL20 y CX3CL1 que promueven el reclutamiento de monocitos y linfocitos periféricos (D' Mello et al., 2009; Wolfe et al., 2018). Las ratas con esteatohepatitis muestran activación de microglía y niveles elevados de CCL2 en cerebelo e hipocampo a las 4 semanas. En ratones con ligadura biliar, la señalización por TNF α periférico estimula la producción por la microglía de CCL2, que promueve la infiltración de monocitos en la corteza cerebral. Esta infiltración no ocurre en ratones que carecen de CCL2 (D' Mello et al., 2009). Además, en ratas la inyección intra-hipocampal de CCL2 induce deterioro cognitivo y de la memoria espacial en el test de reconocimiento de una nueva localización (Chen et al., 2020). En ratas con esteatohepatitis la activación de la microglía y el aumento de CCL2 desencadenarían el reclutamiento de monocitos en las meninges de cerebelo e hipocampo, y en el plexo coroideo de los ventrículos laterales. Estos macrófagos, una vez infiltrados, encontrarían un ambiente pro-inflamatorio y, junto a los linfocitos CD4⁺ infiltrados, contribuirían a promover la neuroinflamación en curso, la activación sostenida de la microglía (Ní Chasaide et al., 2020; Wolfe et al., 2018; McGinley et al., 2020; Balasa et al., 2020) y por tanto contribuirán al deterioro de la memoria espacial (Chen et al., 2020).

El tratamiento con rifaximina durante solo una semana ya es capaz de prevenir la activación de microglía en el hipocampo pero no en el cerebelo, sugiriendo de nuevo que los mecanismos de neuroinflamación deben ser diferentes en ambas áreas cerebrales. A nivel periférico, la rifaximina previene el aumento de TNF α tras una semana de tratamiento pero no el de IL-17. La prevención del aumento de TNF α podría ser suficiente para prevenir la activación de microglía en el hipocampo, mientras que en el cerebelo otras citocinas podrían inducir la activación de microglía. Por ejemplo, la IL-17, cuyo aumento en plasma no se previene con una semana de administración de rifaximina. El aumento de la expresión y activación del receptor de la IL-17 (IL17RA) en células endoteliales se ha asociado a la disminución de ZO1 y de ocludina, lo cual podría ser el mecanismo por el que la IL-17 altera la BHE rápidamente tras solo 2 semanas de daño hepático (Kebir et al., 2017). Sin embargo, la rifaximina sí es capaz de prevenir la disminución de ocludina tras una semana de tratamiento, sugiriendo que por algún mecanismo indirecto adicional debe ejercer su efecto impidiendo la activación de IL17RA o en pasos posteriores de la vía de transducción de señales que lleva a la disminución en la expresión de ocludina. La alteración de la función de células endoteliales debida a la inflamación induce activación de microglía con inducción de la

morfología ameboidea (Xing et al., 2018). La microglía expresa IL17RA constitutivamente y su activación por IL-17 induce aumento de la producción de quimiocinas (Das Sarma et al., 2009). Todo esto sugiere un papel de las células endoteliales en la activación de la microglía en el cerebro, mediado por IL17RA. Sin embargo, es bastante probable que también jueguen un papel TNF α o IL-6 mediante la activación de sus receptores en células endoteliales. Sus niveles también aumentan rápidamente en plasma tras la inducción de daño hepático por CCl₄ (Huang et al., 2012; Rummel et al., 2006).

En esta tesis se muestra que las ratas con esteatohepatitis leve presentan cambios en la inflamación periférica parecidos a los asociados a EHM en pacientes cirróticos, con niveles aumentados de IFN γ , TNF α , CCL20, CX3CL1, IL-15 e IL-17 y aumento de los niveles de linfocitos CD4⁺ autorreactivos (Magas-Losada et al., 2017b). Estos cambios son similares a los que promueven la infiltración de linfocitos y monocitos en otras patologías como la esclerosis múltiple, y dan como resultado la infiltración en meninges de cerebelo e hipocampo de macrófagos y linfocitos T CD4⁺. Los resultados reproducen la infiltración de linfocitos en meninges encontrada en cerebelo de pacientes fallecidos con esteatohepatitis leve (Balzano et al., 2018), lo que indica que las ratas con esteatohepatitis inducida por inyección de CCl₄ son un buen modelo para estudiar los mecanismos involucrados en esta infiltración, sus consecuencias funcionales y conductuales y los enfoques terapéuticos para prevenir o revertir la infiltración y/o sus efectos nocivos.

La activación de microglía precede a la infiltración de las células del sistema inmune, lo que sugiere que en un primer momento la neuroinflamación es desencadenada por la activación por parte de las citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1, IL6, IL-17) de sus receptores en las células endoteliales, lo que induce la activación de la microglía. Esto se asocia con una mayor producción en cerebelo e hipocampo de quimiocinas (CCL2, CCL20 y CX3CL1) que actúan como factores atrayentes para monocitos y linfocitos T CD4⁺, potenciando su infiltración, lo que lleva a una promoción sostenida de neuroinflamación en cerebelo e hipocampo y pérdida neuronal en cerebelo, como ocurre en el cerebelo de pacientes fallecidos con NASH (Balzano et al., 2018). Esto conduce a alteración de la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica en cerebelo e hipocampo, lo que resulta en deterioro cognitivo y motor.

La prevención mediante el tratamiento con rifaximina de la infiltración de células del sistema inmune periférico contribuye a reducir la neuroinflamación y restablecer la neurotransmisión, la coordinación motora y el aprendizaje y memoria espacial en ratas con esteatohepatitis.

Se ha descrito que pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) que muestran niveles suficientemente elevados de hiperamonemia e inflamación presentan deterioro cognitivo y motor (Felipo et al., 2012) y esto sugiere que el proceso descrito en las ratas utilizadas en este estudio también ocurriría en estos pacientes. Los resultados de esta tesis respaldan la idea de que los pacientes con NASH ya pueden presentar deterioro cognitivo y motor antes de alcanzar la cirrosis, y que el tratamiento temprano de estos pacientes con rifaximina evitaría la inducción de estas alteraciones neurológicas.

La progresión del daño hepático se asocia con la evolución de la inflamación periférica y de los cambios en el inmunofenotipo. Estas alteraciones contribuyen al mantenimiento de la neuroinflamación y de las alteraciones en la neurotransmisión.

En cerebelo durante las etapas de esteatohepatitis avanzada y cirrosis se observan las mismas alteraciones descritas en ratas con esteatohepatitis leve, y por tanto las ratas con enfermedad hepática avanzada siguen presentando incoordinación motora. Estos datos también avalan la idea de que el cerebelo es una de las primeras áreas cerebrales que se ven afectadas en la patogénesis de la EHM. En la figura 87 proponemos un resumen de los mecanismos que estarían implicados en la inducción de las alteraciones en cerebelo y de la incoordinación motora en ratas con esteatohepatitis y cirrosis.

El hipocampo está sujeto a más variaciones a lo largo de la progresión de la enfermedad hepática, observándose que diferentes déficits cognitivos modulados por esta área cerebral se inducen en diferentes etapas del daño hepático, y están asociados a diferentes alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica. En la figura 88 proponemos un resumen de los mecanismos que estarían implicados en la inducción de las alteraciones en hipocampo y del deterioro cognitivo en ratas con fallo hepático progresivo. En el estadio de esteatohepatitis la memoria de reconocimiento de una nueva localización y el índice de aprendizaje en el laberinto radial estarían modulados por la neurotransmisión glutamatérgica, y en particular por NR1 y NR2A, y por el TNF α que se libera como consecuencia de la neuroinflamación. La alteración de la memoria de trabajo y de referencia en el laberinto radial en ratas con esteatohepatitis avanzada estaría inducida por el aumento de GluA1 y la disminución de GABA α 1. En

ratas cirróticas la alteración de la memoria de reconocimiento estaría relacionada con el aumento de IL-1 β y el aumento de GABA α 1 en la membrana.

El tratamiento con rifaximina en ratas con esteatohepatitis avanzada y cirrosis normaliza muchos de los cambios en la sangre periférica, previniendo y/o restaurando las alteraciones en la neuroinflamación y la neurotransmisión y como consecuencia el deterioro cognitivo y motor.

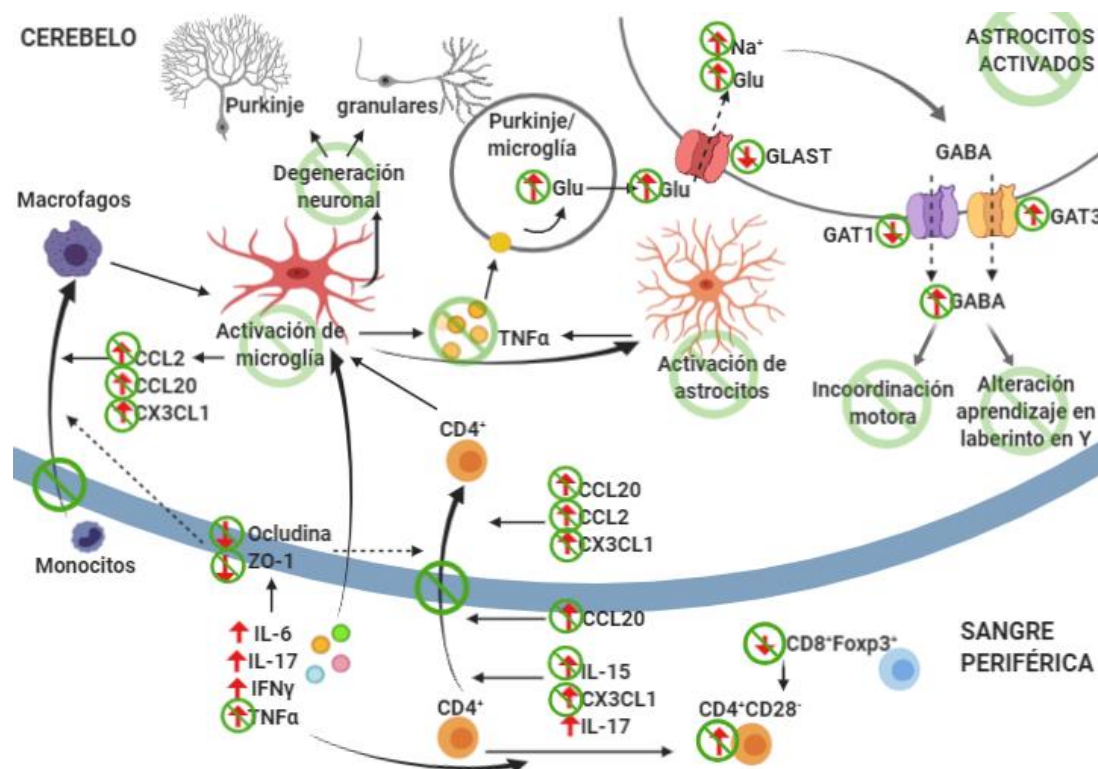



Figura 87. Mecanismos implicados en la inducción de las alteraciones en cerebelo y de la incoordinación motora en ratas con esteatohepatitis y cirrosis. En verde  el efecto de la rifaximina. Ver explicación en el texto.

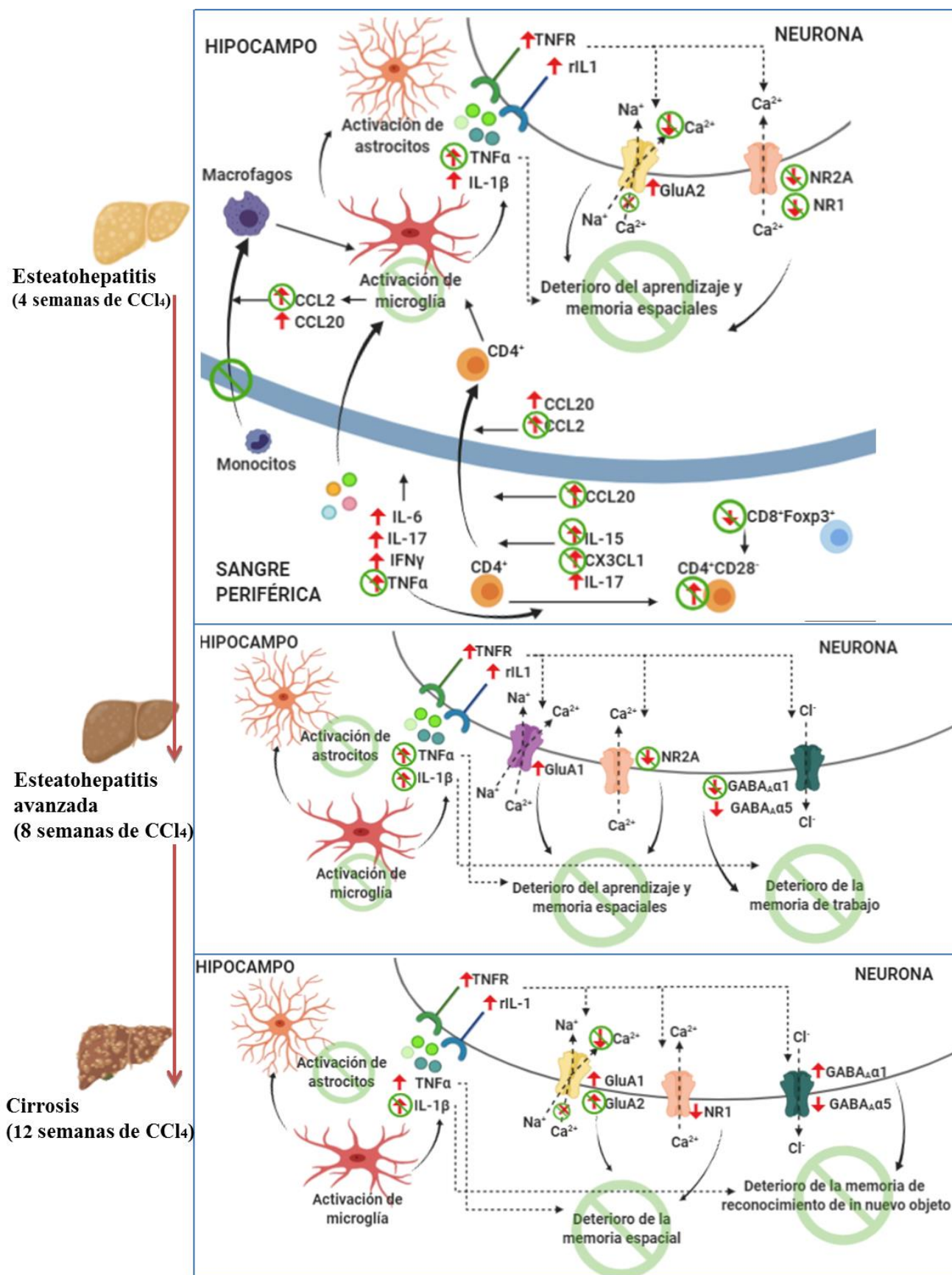



Figura 88. Mecanismos implicados en la inducción de las alteraciones en hipocampo y del deterioro cognitivo en ratas con daño hepático progresivo. En verde  el efecto de la rifaximina. Ver explicación en el texto.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

1. En ratas con fallo hepático inducido por inyección de CCl₄ la incoordinación motora aparece ya en el estadio de esteatohepatitis, y se mantiene hasta el de cirrosis. El tratamiento con rifaximina previene la incoordinación motora en ambas etapas de daño hepático.
2. En ratas con esteatohepatitis el deterioro de la coordinación motora se debe al aumento de los niveles de GABA extracelular en cerebelo, al que contribuyen la reducción de la expresión en membrana de GAT-1 y el aumento del contenido y la reversión de la función de GAT-3. La rifaximina previene todas estas alteraciones.
3. Las alteraciones en la neurotransmisión en cerebelo serían consecuencia de la neuroinflamación. El daño hepático, en todas sus etapas, induce activación de microglía y astrocitos y degeneración neuronal. Dos o más semanas de tratamiento con rifaximina revierten la activación de microglía y previenen la activación de astrocitos y la pérdida neuronal en cerebelo.
4. Diferentes funciones cognitivas moduladas en el hipocampo se alteran en diferentes etapas del daño hepático. El aprendizaje espacial en el laberinto radial y la memoria de reconocimiento de una nueva localización se alteran desde la etapa de esteatohepatitis, mientras que la memoria referencia y la de trabajo se deterioran en esteatohepatitis avanzada y la memoria de reconocimiento de un objeto nuevo no se ve afectada hasta la etapa de cirrosis.
5. Las alteraciones en la función cognitiva están asociadas a cambios en la expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA en hipocampo. El deterioro del aprendizaje y la memoria espaciales en esteatohepatitis está asociado a un aumento de la expresión en membrana de GluA2 y una disminución en membrana de NR1 y NR2A. El deterioro de la memoria de referencia y de la de trabajo en esteatohepatitis avanzada se asocia con un aumento de la expresión en membrana de GluA1 y una disminución en membrana de las subunidades GABA_Aα1 y GABA_Aα5. El deterioro de la memoria de reconocimiento de un nuevo objeto en ratas cirróticas se asocia a una mayor expresión en membrana de GABA_Aα1.
6. La rifaximina previene todas las alteraciones cognitivas. La prevención del deterioro del aprendizaje y la memoria espaciales se asocia a la normalización de la expresión

en membrana de NR1 y NR2A y la prevención del deterioro de la memoria de referencia y de trabajo a la normalización de la expresión en membrana de NR2A y GABA_Aα1.

7. El daño hepático en todas sus etapas induce activación de microglía y astrocitos y aumenta el contenido de TNFα e IL-1β en hipocampo. Las alteraciones en la expresión en membrana de los receptores de GABA y glutamato en hipocampo serían consecuencia de la neuroinflamación. La rifaximina previene el aumento de TNFα en ratas con esteatohepatitis pero no en las ratas con cirrosis hepática, y normaliza el aumento de IL-1β en ratas con daño hepático avanzado pero no en ratas con esteatohepatitis. Estos resultados sugieren que el aumento de TNFα participaría en la inducción del deterioro del aprendizaje y la memoria espaciales en la fase de esteatohepatitis, mientras que el aumento de IL-1β contribuiría al deterioro de la memoria de trabajo en esteatohepatitis avanzada y de la memoria de reconocimiento de un nuevo objeto en cirrosis.
8. Las ratas con esteatohepatitis leve presentan cambios en la inflamación periférica similares a los que desencadenan la EHM en pacientes cirróticos, con niveles elevados de IFNγ, TNFα, CCL20, CX3CL1, IL-15 e IL-17, niveles elevados de linfocitos CD4⁺ autorreactivos y permeabilización de la barrera hematoencefálica. Estos cambios promueven la infiltración de macrófagos y linfocitos CD4⁺ en meninges de cerebelo e hipocampo y en los plexos coroideos de los ventrículos laterales.
9. En cerebelo e hipocampo la infiltración de células del sistema inmune se asocia con un mayor contenido de CCL2, CCL20 y CX3CL1, que actuarían como quimioatrayentes para monocitos y linfocitos CD4⁺, potenciando su infiltración, lo que llevaría a una promoción sostenida de la neuroinflamación y a la pérdida neuronal en cerebelo, como ocurre en los pacientes fallecidos con NASH.
10. El tratamiento con rifaximina reduce el ambiente pro-inflamatorio en sangre periférica y previene la permeabilización de la barrera hematoencefálica y la infiltración de linfocitos T y macrófagos en cerebelo e hipocampo. Esto reduce la neuroinflamación y previene el deterioro de la neurotransmisión, de la coordinación motora y del aprendizaje y la memoria espaciales en ratas con esteatohepatitis.

11. Los resultados obtenidos en ratas con esteatohepatitis apoyan la idea de que los pacientes con esteatohepatitis ya pueden presentar deterioro cognitivo y motor antes de alcanzar la cirrosis y que el tratamiento temprano de pacientes con daño hepático con rifaximina evitaría la aparición o la progresión de estas alteraciones neurológicas.

1. In rats with liver failure due to CCl₄ injection, motor incoordination appears already at the stage of steatohepatitis, and remains until cirrhosis. Rifaximin treatment prevents motor incoordination at both stages of liver failure.
2. In rats with steatohepatitis, impaired motor coordination is due to increased extracellular GABA levels in cerebellum, due to reduced GAT-1 membrane expression, increased GAT-3 content and reversal of GAT-3 function. Rifaximin prevents all these alterations.
3. Alterations in cerebellar neurotransmission would be a consequence of neuroinflammation. Liver damage, in all its stages, induces activation of microglia and astrocytes and neuronal degeneration. Two or more weeks of treatment with rifaximin reverses microglia activation and prevents astrocytes activation and neuronal loss in cerebellum.
4. Different cognitive functions modulated in hippocampus are altered at different stages of liver damage. Spatial learning in the radial maze and object location memory are altered from the steatohepatitis stage, while reference and working memory become impaired at advanced steatohepatitis and object recognition memory is not impaired until the stage of cirrhosis.
5. Alterations in cognitive function are associated with changes in membrane expression in hippocampus of glutamate and GABA receptors. Spatial learning and memory impairment in steatohepatitis is associated with increased GluA2 and decreased NR1 and NR2A membrane expression. Reference and working memory impairment in advanced steatohepatitis is associated with increased GluA1 and decreased GABA_Aα1 and GABA_Aα5 membrane expression. Object recognition memory impairment in cirrhotic rats is associated with increased GABA_Aα1 membrane expression.
6. Rifaximin prevents all cognitive alterations. Prevention of spatial learning and memory impairment is associated with normalization of NR1 and NR2A membrane expression, and prevention of reference and working memory impairment with normalization of NR2A and GABA_Aα1 membrane expression.

7. Liver damage in all its stages induces activation of microglia and astrocytes and increases the content of TNF α and IL-1 β in hippocampus. Alterations in membrane expression of GABA and glutamate receptors in hippocampus would be a consequence of neuroinflammation. Rifaximin prevents the increase in TNF α in rats with steatohepatitis but not in those with liver cirrhosis and reverses the increase in IL-1 β in rats with advanced liver disease but not in rats with steatohepatitis. The results suggest that TNF α increase would participate in inducing spatial learning and memory impairment in the steatohepatitis stage, while IL-1 β increase would contribute to impairment of working memory in advanced steatohepatitis and of object recognition memory in cirrhosis.
8. Rats with mild steatohepatitis show changes in peripheral inflammation similar to those that trigger MHE in cirrhotic patients, with increased levels of IFN γ , TNF α , CCL20, CX3CL1, IL-15 and IL-17, increased levels of autoreactive CD4⁺ lymphocytes and permeabilization of the blood-brain barrier. These changes promote infiltration of macrophages and CD4⁺ lymphocytes in meninges of cerebellum and hippocampus and in choroid plexus of lateral ventricles.
9. In cerebellum and hippocampus infiltration of immune cells is associated with enhanced production of CCL2, CCL20 and CX3CL1 which would act as chemoattractants for monocytes and CD4⁺ lymphocytes, potentiating their infiltration, leading to sustained promotion of neuroinflammation and neuronal loss in cerebellum, as occurs in patients died with NASH.
10. Treatment with rifaximin reduces the pro-inflammatory environment in peripheral blood and prevents the permeabilization of the blood-brain barrier and T lymphocytes and macrophages infiltration in cerebellum and hippocampus. This reduces neuroinflammation and prevents impairment of neurotransmission, of motor coordination, and of spatial learning and memory in rats with steatohepatitis.
11. The results reported in rats with steatohepatitis support the idea that patients with NASH may already present cognitive and motor impairment before reaching cirrhosis and that early treatment of patients with liver damage with rifaximin would prevent induction or progression of these neurological alterations.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surg Clin North Am.*, 90(4), 643–653.
- Abdou, R.M., Zhu, L., Baker, R.D., Baker, S.S. (2016). Gut Microbiota of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*, 61(5):1268–81.
- Acharya, C., Bajaj, S. (2018). Current Management of Hepatic Encephalopathy. *Am J Gastroenterol*, 113:1600–1612.
- Adams, L.A., Angulo, P., Lindor, K.D. (2005a) Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*; 172(7): 899–905.
- Adams, L.A., Lymp, J.F., Sauver J.S., Sanderson, S.O., Lindor, K.D., Feldstein, A., Angulo, P. (2005b). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, 129(1):113–121.
- Affò, S., Morales-Ibanez, O., Rodrigo-Torres, D., Altamirano, J., Blaya, D., Dapito, D.H., Millán, C., Coll, M., Caviglia, J.M., Arroyo, V., Caballería, J., Schwabe, R.F., Ginès, P., Bataller, R., Sancho-Bru, P. (2014). CCL20 mediates lipopolysaccharide induced liver injury and is a potential driver of inflammation and fibrosis in alcoholic hepatitis. *Gut*, 63(11):1782–92.
- Agrawal A, Sharma Bc, Sharma P, et al. (2012). Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: an open-label, randomized controlled trial of lactulose, probiotics, and no therapy. *Am J Gastroenterol*, 107:1043–50.
- Aguilar, M.A., Miñarro, J., Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp. Neurol.*, 161:704–713.
- Agusti, A., Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., Felipo, V. (2011). p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut*, 60:1572–1579.
- Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Ibañez-Grau, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Llansola, M., Montoliu, C., Felipo, V. (2017). Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS Neurosci Ther*, 23:386–394.
- Ahboucha, S., Pomier-Layrargues, G., Mamer, O., Butterworth, R.F. (2006). Increased levels of pregnenolone and its neuroactive metabolite allopregnanolone in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *Neurochem Int.*, 49:372–378.
- Ahluwalia, V., Wade, J.B., Heuman, D.M., Hammeke, T.A., Sanyal, A.J., Sterling, R.K., Stravitz, R.T., Luketic, V., Siddiqui, M.S., Puri, P., Fuchs, M., Lennon, M.J., Kraft, K.A., Gilles, H., White, M.B., Noble, N.A., Bajaj, J.S. (2014). Enhancement of functional connectivity, working memory and inhibitory control on multi-modal brain MR imaging with Rifaximin in Cirrhosis: implications for the gut-liver-brain axis. *Metab. Brain Dis.*, 29:1017–1025.
- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., Rossi, F.M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 10(12):1538–1543.
- Al-Ani, S.A. (2015). Analysis of breath allows for non-invasive identification and quantification of diseases and metabolic dysfunction. (Tesis doctoral). Universidad de Berlín, Berlín.
- Altamirano-Barrera, A., Uribe, M., Chávez-Tapia, N. C., Nuño-Lámbardi, N. (2018). The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 60:1–8.
- Amlal, H., Soleimani, M. (1997). K⁺/NH₄⁺ antiporter: a unique ammonium carrying transporter in the kidney inner medulla. *Biochim. Biophys. Acta* 1323:319–333.
- Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A., Morgan, M.Y. (2004). Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metab. Brain. Dis.*, 19:253–267.

Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O'shea, J.J., M. Shevach, E.M. (2008). CD4+FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J Exp Med.*, 205(9): 1975–1981.

Antonelli, A., Fallahi, P., Delle Sedie, A., Ferrari, S.M., Maccheroni, M., Bombardieri, S., Riente, L., Ferrannini, E. (2009). High values of Th1 (CXCL10) and Th2 (CCL2) chemokines in patients with psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 27(1):22-7.

Aoki, Y., Hirai, K. and Tanikawa, K. (1993). Mechanism of thrombocytopenia in liver cirrhosis: kinetics of indium-111 tropolone labelled platelets. *European journal of nuclear medicine*, 20(2):123–9.

Arab, J.P., Martin-Mateos, R.M., Shah, V.H. (2018). Gut-liver axis, cirrhosis and portal hypertension: the chicken and the egg. *Hepatol Int.*, 12(Suppl 1):24-33.

Arima Y., Harada, M., Kamimura, D., et al. (2012). Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*, 148:447–457.

Aronson, D.C., Chamuleau, R.A., Frederiks, W.M., Gooszen, H.G., Heijmans, H.S., James, J. (1993). Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? *J. Hepatol.*, 18:85–95.

Arosa, F.A. (2002). CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunology and cell biology*, 80(1):1–13.

Arosa, F.A., Esgalhado, A.J., Padrao, C.A., Cardoso, E.M. (2017). Divide, conquer, and sense: CD8(+)CD28(–) T cells in perspective. *Front Immunol*, 7: 665.

Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., Van Der Veen, J., Deroos, P., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480):451–5.

Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A.M., Feldstein, A.E. (2016). Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*, 61(5):1294-303.

Arriada-Mendicoa, N., Otero-Siliceo, E., Corona-Vazquez, T. (1999). Current concepts regarding the cerebellum and cognition. *Rev Neurol.*, 29:1075-1082.

Aseni, P., Frangi, M., Beati, C., Vertemati, M., Romani, F. (1988). Is thrombocytopenia in liver failure dependent on an inadequate synthesis of thrombopoietic stimulating factor by the liver. *Medical hypotheses*, 26(4):217–9.

Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A., Trinchieri, G. (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *Journal of immunology*, 160(12):5936–44.

Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., et al. (2008). ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature*, 455(7214):808–12.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., et al. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, 331(6015):337–41.

Attridge, K., Wang, C.J., Wardzinski, L., Kenefick, R., Chamberlain, J.L., Manzotti, C., Kopf, M., Walker, L.S. (2012). IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *BLOOD*, 119(20):4656–64.

Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., Yirmiya, R. (2003). Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus*, 13(7):826–834.

Azorín, I., Miñana, M.D., Felipo, V., Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology*, 10:311–314.

- Baeck, C., Wehr, A., Karlmark, K.R., Heymann, F., Vucur, M., Gassler, N., Huss, S., Klussmann, S., Eulberg, D., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F. (2012). Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut*, 61(3):416-26.
- Bai, M., Yang, Z., Qi, X., Fan, D., Han, G. (2013). L-ornithine-l-aspartate for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Gastroenterol Hepatol*, 28:783–792.
- Bajaj, J. S., Barbara, G., Dupont, H. L., Mearin, F., Gasbarrini, A., Tack, J. (2018). New concepts on intestinal microbiota and the role of the non-absorbable antibiotics with special reference to rifaximin in digestive diseases. *Digestive and Liver Disease*, 50(8):741–749.
- Bajaj, J.S., Saeian, K., Schubert, C.M., Hafeezullah, M., Franco, J., Varma, R.R., Gibson, D.P., Hoffmann, R.G., Stravitz, R.T., Heuman, D.M., Sterling, R.K., Shiffman, M., Topaz, A., Boyett, S., Bell, D., Sanyal, A.J. (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology*, 50:1175-1183.
- Bajaj, J.S., Riggio, O. (2010). Drug therapy: rifaximin. *Hepatology*, 52(4):1484-8.
- Bajaj, J.S., Heuman, D.M., Wade, J.B., Gibson, D.P., Saeian, K., Wegelin, J.A., Hafeezullah, M., Bell, D.E., Sterling, R.K., Stravitz, R.T., et al. (2011). Rifaximin improves driving simulator performance in a randomized trial of patients with minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 140:478–487.
- Bajaj, J.S., Heuman, D.M., Sanyal, A.J., Hylemon, P.B., Sterling, R.K., Stravitz, R.T., Fuchs, M., Ridlon, J.M., Daita, K., Monteith, P., et al. (2013). Modulation of the metabiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS One*, 8:e60042.
- Bajaj, J.S., Heuman, D.M., Hylemon, P.B., et al. (2014). Randomised clinical trial: Lactobacillus GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 39:1113–25.
- Bajaj, J.S., Betrapally, N.S., Hylemon, P.B., Heuman, D.M., Daita, K., White, M.B., et al. (2015a). Salivary microbiota reflects changes in gut microbiota in cirrhosis with hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 62(4):1260-71.
- Bajaj, J.S., Barrett, A.C., Bortey, E., Paterson, C., Forbes, W.P. (2015b). Prolonged remission from hepatic encephalopathy with rifaximin: results of a placebo crossover analysis. *Aliment Pharmacol Ther*, 41: 39–45.
- Bajaj, J.S. (2016). Review article: potential mechanisms of action of rifaximin in the management of hepatic encephalopathy and other complications of cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 43 Suppl 1:11-26.
- Bajaj, J.S., Kassam, Z., Fagan, A., Gavis, E.A., Liu, E., Cox, I.J., Kheradman, R., Heuman, D., Wang, J., Gurry, T., Williams, R., Sikaroodi, M., Fuchs, M., Alm, E., John, B., Thacker, L.R., Riva, A., Smith, M., Taylor-Robinson, S.D., Gillevet, P.M. (2017). Fecal microbiota transplant from a rational stool donor improves hepatic encephalopathy: a randomized clinical trial. *Hepatology*, 66:1727–1738.
- Baker, K.B., Kim, J.J. (2002). Effects of Stress and Hippocampal NMDA Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *Learn Mem*, 9(2): 58–65.
- Balasa, R., Barcutean, L., Balasa, A., et al. (2020). The action of TH17 cells on blood brain barrier in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Hum Immunol*, 81(5):237-243.
- Balzano, T. (2017). Caracterización de la neuroinflamación en modelos animales y en pacientes con encefalopatía hepática. Implicaciones terapéuticas. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.
- Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., Urios, A., Montoliu, C., Felipe, V. (2018). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Sci Rep.*, 8(1):3004.

- Balzano, T., Arenas, Y. M., Dadsetan, S., Forteza, J., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Gracià, F., Varela-Andrés, N., Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V. (2020). Sustained hyperammonemia induces TNF- α IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- κ B pathway. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1).
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Broadwell, R.D. (1995). Passage of Cytokines across the Blood-Brain Barrier. *Neuroimmunomodulation*, 2:241–248
- Banks, W.A., Robinson, S.M. (2010). Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain Behav. Immun.*, 24:102–109.
- Barker, G.R.I., Warburton, E.C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *J. Neurosci.*, 31:10721–10731.
- Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schläger, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E., Flügel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., Flügel, A. (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*, 462:94–8.
- Bashiardes, S., Shapiro, H., Rozin, S., Shibolet, O., Elinav, E. (2016). Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota. *Mol Metab*, 5(9):782-94.
- Bass, N.M., Mullen, K.D., Sanyal, A., et al. (2010). Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med*, 362: 1071–81.
- Beaumont, M., Goodrich, J.K., Jackson, M.A., Yet, I., Davenport, E.R., Vieira-Silva, S., Debelius, J., Pallister, T., Mangino, M., Rae, J., Knight, R., Clark, A.G., Ley, R.E., Spector, T.D., Bell, J.T. (2016). Heritable components of the human fecal microbiome are associated with visceral fat. *Genome Biol*, 17(1):189.
- Bechmann, I., Galea, I., Perry, V.H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.*, 28:5–11.
- Belkaid, Y., Hand, T. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell*, 157(1): 121–141.
- Bellot, P., Frances, R., Such, J. (2013). Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*, 33(1):31-9.
- Bengtsson, F., Nobin, A., Falck, B., Gage, F.H., Jeppsson, B. (1986). Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24:1611–1616.
- Bentivoglio, M., Mariotti, R., Bertini, G. (2011). Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain Res Rev*, 66:152–173.
- Berard, M., Tough, D.F. (2002). Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology*, 106(2):127-38.
- Bercik, P. (2011). The microbiota-gut-brain axis: learning from intestinal bacteria? *Gut*, 60:288–289.
- Bilbo, S.D., Smith, S.H., Schwarz, J.M. (2012). A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7:24–41.
- Blandizzi, C., Viscomi, G.C., Marzo, A., Scarpignato, C. (2014). Is generic rifaximin still a poorly absorbed antibiotic? A comparison of branded and generic formulations in healthy volunteers. *Pharmacol Res*, 85:39–44.
- Blaschitz, C., Raffatellu, M. (2010). Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *Journal of clinical immunology*, 30(2):196–203.

- Boyer, L., Richieri, R., Dassa, D., Boucekine, M., Fernandez, J., Vaillant, F., Padovani, R., Auquier, P., Lancon, C. (2013). Association of metabolic syndrome and inflammation with neurocognition in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*, 210:381–386.
- Boscá, L., González-Ramos, S., Prieto, P., Fernández-Velasco, M., Mojena, M., Martín-Sanz, P., Alemany, S. (2015). Metabolic signatures linked to macrophage polarization: from glucose metabolism to oxidative phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 43(4):740–4.
- Brady, J., Carotta, S., Thong, R.P., Chan, C.J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Nutt, S.L. (2010). The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *Journal of immunology*, 185(11):6679–88.
- Brahe, L.K., Astrup, A., Larsen, L.H. (2013). Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? *Obes Rev*, 14:950–959.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L.G., Kundu, P., Gulyas, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B.T., Diamond, B., Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.*, 6:263ra158.
- Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R., Feldmann, M. (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2(8657):244–7.
- Brigidi, P., Swennen, E., Rizzello, F., Bozzolasco, M., Matteuzzi, D. (2002). Effects of rifaximin administration on the intestinal microbiota in patients with ulcerative colitis. *J Chemother*, 14:290–295.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS*, 101:14515–14520.
- Broux, B., Markovic-Plese, S., Stinissen, P., Hellings, N. (2012a). Pathogenic features of CD4+CD28- T cells in immune disorders. *Trends in molecular medicine*, 18(8): 446–53.
- Broux, B., Pannemans, K., Zhang, X., Markovic-Plese, S., Broekmans, T., Eijnde, B.O., Van Wijmeersch, B., Somers, V., Geusens, P., Van Der Pol, S., Van Horssen, J., Stinissen, P., Hellings, N. (2012b). CX(3)CR1 drives cytotoxic CD4(+)/CD28(-) T cells into the brain of multiple sclerosis patients. *Journal of autoimmunity*, 38(1):10–9.
- Broux, B., Mizze, M.R., Vanheusden, M., Van Der Pol, S., Van Horssen, J., Van Wijmeersch, B., Somers, V., De Vries, H.E., Stinissen, P. and Hellings, N. (2015). IL-15 amplifies the pathogenic properties of CD4+CD28- T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology*, 194(5):2099–109.
- Brown, E.L., Xue, Q., Jiang, Z.D., Xu, Y., Dupont, H.L. (2010). Pretreatment of epithelial cells with rifaximin alters bacterial attachment and internalization profiles. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:388–396.
- Brown, G.C., Neher, J.J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci.*, 15(4):209–16.
- Browne, C.A., Clarke, G., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2012). An effective dietary method for chronic tryptophan depletion in two mouse strains illuminates a role for 5-HT in nesting behaviour. *Neuropharmacology*, 62:1903–1915.
- Browning, J.D., Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.*, 114(2):147–152.
- Browning, K.N., Mendelowitz, D. (2003). Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? II. Integration of afferent signaling from the viscera by the nodose ganglia. *Am. J. Phys.-Gastr.*, L284:G8–G14.
- Brunt, E.M. (2000). Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the knodell histology activity index and beyond. *Hepatology*, 31(1):241–246.

- Bowman, C.C., Rasley, A., Tranguch, S.L., Marriott, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, 43:281–291.
- Bucci, L., Palmieri, G.C. (1993) Double-blind, double-dummy comparison between treatment with rifaximin and lactulose in patients with medium to severe degree hepatic encephalopathy. *Curr Med Res Opin*, 13:109–18.
- Bull, M.J., Plummer, N.T. (2014). The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med*, 13(6):17-22.
- Burt, A., Ferrell, L., Hubsher, S.G. (2018a). Chapter 1: Structure, Function, and Responses to injury. *MacSween's Pathology of the Liver, 7th Edition*, 1-66.
- Burt, A., Ferrell, L., Hubsher, S.G. (2018b). Chapter 5: Fatty liver disease. *MacSween's Pathology of the Liver, 7th Edition*, 308-371.
- Bustamante, J., Rimola, A., Ventura, P.J., Navasa, M., Cirera, I., Reggiardo, V., Rodés, J. (1999). Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol.*, 30:890–895.
- Butcher, E.C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., Briskin, M. (1999). Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol*, 72:209–253.
- Butz, M., Timmermann, L., Braun, M., Groiss, S.J., Wojtecki, L., Ostrowski, S., Krause, H., Pollok, B., Gross, J., Südmeyer, M., Kircheis, G., Häussinger, D., Schnitzler, A. (2010). Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta Neurol Scand.*, 122(1):27-35.
- Cabrera-Pastor, A. (2014). Modulación de la vía Glu-NO-GMPc y del aprendizaje por GMPc extracelular en cerebelo. Mecanismos moleculares implicados. Alteraciones en modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.
- Cabrera-Pastor, A., Hernández-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., Felipo, V. (2016a). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- α and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 β , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain Behav. Immun.*, 57:360–370.
- Cabrera-Pastor, A., Malaguerma, M., Taoro-Gonzalez, L., Llansola, M., Felipo, V. (2016b). Extracellular cGMP Modulates Learning Biphasically by Modulating Glycine Receptors, CaMKII and Glutamate-Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Sci Rep.*, 6:33124.
- Cabrera-Pastor, A., Balzano, T., Hernández-Rabaza, V., Malaguerma, M., Llansola, M., Felipo, V. (2018). Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats. *Brain Behav Immun.*, 69:386-398.
- Cabrera-Pastor, A., Arenas, Y.M., Taoro-Gonzalez, L., et al. (2019). Chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine and GABA and membrane expression of their transporters in rat cerebellum. Modulation by extracellular cGMP. *Neuropharmacology*, 161:107496.
- Cagnin, A., Taylor-Robinson, S.D., Forton, D.M., Banati, R.B. (2006). In vivo imaging of cerebral “peripheral benzodiazepine binding sites” in patients with hepatic encephalopathy. *Gut*, 55(4):547–53.
- Cahill, R.N., Poskitt, D.C., Frost, D.C., Trnka, Z. (1977). Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. *J Exp Med*, 145:420–428.
- Cao, Y., Amezquita, R.A., Kleinstein, S.H., et al. (2016). Autoreactive T Cells from Patients with Myasthenia Gravis Are Characterized by Elevated IL-17, IFN- γ , and GM-CSF and Diminished IL-10 Production. *J Immunol*, 196:2075–2084.
- Carlson G.P. (1975). Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats by pretreatment with polychlorinated biphenyls. *Toxicology*, 5(1):69-77.

- Casafont Morencos, F., De Las Heras Castano, G., Martin Ramos, L., Lopez Arias, M.J., Ledesma, F., Pons Romero, F. (1996). Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci*, 41(3):552-6.
- Caucheteux, S.M., Torabi-Parizi, P., Paul, W.E. (2013). Analysis of naïve lung CD4 T cells provides evidence of functional lung to lymph node migration. *PNAS*, 110(5):1821-1826
- Cauli, O., Mlili, N., Rodrigo, R., Felipo, V. (2007a). Hyperammonaemia alters the mechanisms by which metabotropic glutamate receptors in nucleus accumbens modulate motor function. *J. Neurochem.*, 103:38–46.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., Felipo, V. (2007b). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*. 2007;46, 514–519.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., Mlili, N. El, Boix, J., Agustí, A., Felipo, V. (2009a). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.*, 24:69–80.
- Cauli, O., Mansouri, M.T., Agusti, A., Felipo, V. (2009b). Hyperammonemia increases GABAergic tone in cerebellum but decreases it in rat cortex. *Gastroenterology*, 136(4):1359–67.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Llansola, M., Mansouri, M.T., Felipo, V. (2009c). Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *J Neurosci Res.*, 87:1369-74.
- Cédile, O., Wlodarczyk, A., Owens, T. (2017). CCL2 recruits T cells into the brain in a CCR2-independent manner. *APMIS*, 125:945–956.
- Ceeraz, S., Hall, C., Choy, E.H., Spencer, J., Corrigan, V.M. (2013). Defective CD8+CD28+ regulatory T cell suppressor function in rheumatoid arthritis is restored by tumour necrosis factor inhibitor therapy. *Clinical and experimental immunology*, 174(1):18–26.
- Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical Immunology*, 125(2):S3–23.
- Chabaud, M., Page, G., Miossec, P. (2001). Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol*, 167:6015–6020.
- Charlett, A., Dobbs, R.J., Dobbs, S.M., Weller, C., Brady, P., Peterson, D.W. (1999). Parkinsonism: siblings share *Helicobacter pylori* seropositivity and facets of syndrome. *Acta Neurol. Scand.*, 99:26–35.
- Chen, W. , Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., Mcgrady, G., Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.*, 198(12):1875-86.
- Chen, X.-W.W., Zhou, S.F.F. (2015). Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF-κB axis, and tumorigenesis. *Drug design, development and therapy*, 9: 2941–6.
- Chen, J., Tan, L., Liao, Y., Long, J., et al. (2020). Chemokine CCL2 Impairs Spatial Memory and Cognition in Rats via Influencing Inflammation, Glutamate Metabolism and Apoptosis-Associated Genes Expression- A Potential Mechanism for HIV-associated Neurocognitive Disorder. *Life Sci*, 15;255:117828.
- Cheng, J., Shah, Y.M., Ma, X., Pang, X., Tanaka, T., Kodama, T., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J. (2010). Therapeutic role of rifaximin in inflammatory bowel disease: clinical implication of human pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 335:32–41.

- Cherniack, E.P. (2012). A berry thought-provoking idea: the potential role of plant polyphenols in the treatment of age-related cognitive disorders. *Br. J. Nutr.*, 108:794–800.
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y., Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of experimental medicine*, 203:2841–2852.
- Chouard, T., Gray, N. (2010). Glia. *Nature*, 468(7321):213.
- Christensen, A.L. (1984). Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scand J Work Environ Health*, 10 Suppl 1:33–34.
- Collins, S.M., Surette, M., Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol*, 10(11):735–42.
- Columba-Cabezas, S., Griguoli, M., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Ria, F., Serafini, B., Aloisi, F. (2006). Suppression of established experimental autoimmune encephalomyelitis and formation of meningeal lymphoid follicles by lymphotoxin beta receptor-Ig fusion protein. *J Neuroimmunol*. 179:76–86.
- Compañy, L., Zapater, P., Pérez-Mateo, M. and Jover, R. (2010). Extrapyrmidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 22(5):519–25.
- Conn, H.O., Lieberthal, M.M. (1979). Chapter 1: The syndrome of portal-systemic encephalopathy. *The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose*, 1–45.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 204(8):1757–64.
- Córdoba, J., Cabrera, J., Lataif, L., Penev, P., Zee, P., Blei, A.T. (1998). High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology*, 27:339–345.
- Correale, J., Villa, A. (2010). Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 67:625–638.
- Corthay, A. (2009). How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology*, 70(4):326–36.
- Costello, E.K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B.J., Relman, D.A. (2012). The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science*, 336(6086):1255–62.
- Cox, L.M., Weiner, H.L. (2018). Microbiota Signaling Pathways that Influence Neurologic Disease. *Neurotherapeutics*, 15(1): 135–145.
- Crabb, D.W., Galli, A., Fisher, M., You, M. (2004). Molecular mechanisms of alcohol fatty liver: role of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Alcohol*, 34(1):35–38.
- Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*, 27:147–63.
- Cross, T.J. (2017). Liver disease in clinical practice. *Springer International Publishing*. Pages 57–70.
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernández-Rabaza, V., Gomez-Gimenez, B., Elmlili, N., Llansola, M., et al. (2016a). Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *J Neuroinflammation*, 13:245.
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernández-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J.-M., Agusti, A., et al. (2016b). Reducing Peripheral

Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Front Mol Neurosci*, 9:106.

Dalal, R., Mcgee, R.G., Riordan, S.M., Webster, A.C. (2017). Probiotics for people with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2:CD008716.

Damgaard, T., Plath, N., Neill, J.C., Hansen, S.L. (2011). Extrasynaptic GABA_A receptor activation reverses recognition memory deficits in an animal model of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 214:403–413.

Dansokho, C., Ait Ahmed, D., Aid, S., Toly-Ndour, C., Chaigneau, T., Calle, V., Cagnard, N., Holzenberger, M., Piaggio, E., Aucouturier, P., Dorothée, G. (2016). Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain: a journal of neurology*, 139:1237–51.

Dantzer, R., Konsman, J.P., Bluthé, R.M., Kelley, K.W. (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton. Neurosci*, 85:60–65.

Darkoh, C., Lichtenberger, L.M., Ajami, N., Dial, E.J., Jiang, Z.D., Dupont, H.L. (2010). Bile acids improve the antimicrobial effect of rifaximin. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:3618–24.

Das Sarma, J., Ciric, B., Marek, R., Sadhukhan, S., Caruso, M. L., Shafagh, J., Rostami, A. (2009). Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*, 6(1):14.

Davis, P. (1934). Carbon tetrachloride as an industrial hazard. *JAMA*, 103:962–966.

Day C.P., James O.F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*, 114(4): 842–845.

De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Pestarino, M., Usai, C., Marchetti, C., Fedele, E., Fontana, G., Raiteri, M. (1996). Ectocellular in vitro and in vivo metabolism of cADP-ribose in cerebellum. *Biochem. J.*, 320 (Pt 2): 665–671.

De Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., Schröder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res.*, 156(1):139–43.

De Marco, F., Santamaria Amato, P., D'ariento, A. (1984). Rifaximin in collateral treatment of portal-systemic encephalopathy: a preliminary report. *Curr Ther Res*, 36:668–74.

Dennis, C.V., Sheahan, P.J., Graeber, M.B., Sheedy, D.L., Kril, J.J., Sutherland, G.T. (2014). Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.*, 29:1027–39.

Denniston, D.J., Thomas, M.G., Kane, K.K., Roybal, C.N., Canales, L., Hallford, D.M., Remmenga, M.D., Hawkins, D.E. (2003). Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal or ovariectomized state. *Anim Reprod Sci.*, 78: 25–31.

De Palma, G., Lynch, M.D., Lu, J., Dang, V.T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P.M., Pigrau Pastor, M., Sidani, S., Pinto-Sanchez, M.I., Philip, V., Mclean, P.G., Hagelsieb, M.G., Surette, M.G., Bergonzelli, G.E., Verdu, E.F., Britz-Mckibbin, P., Neufeld, J.D., Collins, S.M., Bercik, P. (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci Transl Med*, 9(379).

Descombe, J.J., Dubourg, D., Picard, M., Palazzini, E. (1994). Pharmacokinetic study of rifaximin after oral administration in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Res*, 14:51–6.

Desmond Je, Gabrieli Jd, Wagner Ad, Ginier Bl, Glover Gh. (1997). Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci.*, 17: 9675–9685.

- Dhiman, R.K., Chawla, Y.K. (2009). Minimal hepatic encephalopathy. *Indian J. Gastroenterol.*, 28:5–16.
- Dhungana, A., Sapkota, S., Singh, A.R., Sinha, J.N. (2017). A Comparative Study of Pseudocholinesterase Activities in Relation to Transaminases, GGT and ALP in Liver Disorder in Hospital Based Study. *International Annals of Medicine*, 1(8).
- Diamond, B., Huerta, P.T., Tracey, K., Volpe, B.T. (2011). It takes guts to grow a brain: increasing evidence of the important role of the intestinal microflora in neuro- and immune-modulatory functions during development and adulthood. *Bioessays*, 33:588–591.
- Dinareello, C.A., Novick, D., Kim, S., Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in immunology*, 4:289.
- Ding, X., Saxena, N.K., Lin, S., Xu, A., Srinivasan, S., Anania, F.A. (2005). The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol.*, 166(6): 1655–1679.
- Di Piazza, S., Gabriella Filippazzo, M., Valenza, L.M., et al. (1991). Rifaximine versus neomycin in the treatment of portosystemic encephalopathy. *Ital J Gastroenterol*, 23: 403–7.
- Disabato, D., Quan, N., Godbout, J.P. (2016). Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *J Neurochem.*, 139(Suppl 2): 136–153.
- D'mello, C., Le, T., Swain, M.G. (2009). Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci*, 29:2089–2102.
- Doukas, J., Pober, J.S. (1990). IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *The Journal of Immunology*, 145:1727–33.
- Du, S., Li, Z., Xie, X., et al. (2020). IL-17 stimulates the expression of CCL2 in cardiac myocytes via Act1/TRAF6/p38MAPK-dependent AP-1 activation. *Scand J Immunol*, 91:e12840.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, 10(8):857–63.
- Dumitriu, I.E., Araguás, E.T., Baboonian, C., Kaski, J.C. (2009). CD4+ CD28 null T cells in coronary artery disease: when helpers become killers. *Cardiovascular research*, 81(1):11–9.
- Dumitriu, I.E. (2015). The life (and death) of CD4+ CD28 (null) T cells in inflammatory diseases. *Immunology*, 146 (2):185–93.
- Dupont, H.L., Jiang, Z.D., Ericsson, C.D., et al. (2001). Rifaximin versus ciprofloxacin for the treatment of traveler's diarrhea: a randomized, double-blind clinical trial. *Clin Infect Dis*, 33:1807–15.
- Dupont H.L. (2016). Review article: the antimicrobial effects of rifaximin on the gut microbiota. *Aliment Pharmacol Ther*, 43 Suppl 1:3–10.
- Eftimiadi, C., Deleo, C., Schito, G. (1984). Treatment of hepatic encephalopathy with L/105, a new non-absorbable rifamycin. *Drugs Exp Clin Res*, 10:691–6.
- Ek, M., Kurosawa, M., Lundeberg, T., Ericsson, A. (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 β : role of endogenous prostaglandins. *J. Neurosci.*, 18:9471–9479.
- Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews*, 229(1):152–172.

- Elizondo, A., Araya, J., Rodrigo, R., Poniachik, J., Csendes, A., Maluenda, F., Díaz, J.C., Signorini, C., Sgherri, C., Comporti, M., et al. (2007). Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring)*, 15:24–31.
- Eng, L., Ghirnikar, R., Lee, Y. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: Gfap-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochem Res.*, 25(9–10):1439–51.
- Engelhardt, B., Ransohoff, R.M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.*, 33(12):579–89.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., Felipo, V. (2005a). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology*, 41:299–306.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., Felipo, V. (2005b). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res.*, 1036:115–121.
- Erny, D., Hrabé De Angelis, A.L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Muhlaker, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermohlen, O., Chun, E., Garrett, W.S., McCoy, K.D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. Neurosci.*, 18:965–77.
- Eroglu, C., Barres Ba. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468(7321):223–231.
- Evans, R.M., Barish, G.D., Wang, Y.X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.*, 10(4): 1–7.
- Farber D.L., Yudanin, N.A., Restifo, N.P. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.*, 14(1): 24–35.
- Feldmann, M., Brennan, F.M., Foxwell, B.M., Maini, R.N. (2001). The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Current Directions in Autoimmunity*, 3:188–99.
- Felipo, V., Miñana, M.D., Grisolia, S. (1988a). Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *Eur. J. Biochem.*, 176:567–571.
- Felipo, V., Butterworth, R.F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol.*, 67(4):259–279
- Felipo, V. (2008). Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 3rd Ed. Kluwer Acad./Plenum Publishers, USA.; vol 24:1–27.
- Felipo, V., Ordoño, J.F., Urios, A., El Mili, N., Giménez-Garzó, C., Aguado, C., González-Lopez, O., Giner-Duran, R., Serra, M.A., Wassel, A., Rodrigo, J.M., Salazar, J., Montoliu, C. (2012a). Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology*, 55(2):530–9.
- Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M.L., Civera, M., Olmo, J.A., Ortega, J., Martínez-Valls, J., Serra, M.A., Cassinello, N., Wassel, A., Jordá, E., Montoliu, C. (2012b) Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.*, 27(1):51–58.
- Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci*, 14(12):851–8.
- Felipo, V., Urios, A., Giménez-Garzó, C., Cauli, O., Andrés-Costa, M.J., González, O., Serra, M.A., Sánchez-González, J., Aliaga, R., Giner-Durán, R., Belloch, V., Montoliu, C. (2014). Non-invasive blood flow measurement in cerebellum detects minimal hepatic encephalopathy earlier than psychometric tests. *World J Gastroenterol.*, 20(33):11815–25.

- Feng, F., Liu, Y., Liu, G., Zhu, P., Zhu, M., Zhang, H., Lu, X., Liu, J., Luo, X., Yu, Y. (2018). *Front Immunol.*, 9:1442.
- Fera, G., Agostinacchio, F., Nigro, M., et al. (1993). Rifaximin in the treatment of hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Res*, 4(1):57–66.
- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., and Blei, A.T. (2002). Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 35:716–721.
- Fernández, J., Arroyo, V. (2010). Chronic liver failure: a clinical entity in need of researchers. *Gastroenterol Hepatol*, 33(9):619–20.
- Ferretti, E., Pistoia, V., Corcione, A. (2014). Role of Fractalkine/CX3CL1 and Its Receptor in the Pathogenesis of Inflammatory and Malignant Diseases with Emphasis on B Cell Malignancies. *Mediators Inflamm.* 2014: 480941.
- Festi, D., Mazzella, G., Orsini, M., et al. (1993). Rifaximin in the treatment of chronic hepatic encephalopathy; results of a multicenter study of efficacy and safety. *Curr Ther Res*, 54:598–609.
- Filaci, G., Fenoglio, D., Fravega, M., Ansaldi, G., Borgonovo, G., Traverso, P., Villaggio, B., Ferrera, A., Kunkl, A., Rizzi, M., Ferrera, F., Balestra, P., Ghio, M., Contini, P., Setti, M., Olive, D., Azzarone, B., Carmignani, G., Ravetti, J.L., Torre, G., Indiveri, F. (2007). CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *Journal of immunology*, 179(7):4323–34.
- Finegold, S.M., Molitoris, D., Vaisanen, M.L. (2009). Study of the in vitro activities of rifaximin and comparator agents against 536 anaerobic intestinal bacteria from the perspective of potential utility in pathology involving bowel flora. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:281–6.
- Fiorucci, S., Distrutti, E., Mencarelli, A., Barbanti, M., Palazzini, E., Morelli, A. (2002). Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocytic cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. *Digestion*, 66:246–256.
- Fong, Y., Tracey, K.J., Moldawer, L.L., Hesse, D.G., Manogue, K.B., Kenney, J.S., Lee, A.T., Kuo, G.C., Allison, A.C., Lowry, S.F. (1989). Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *The Journal of experimental medicine*. 170(5):1627–33.
- Furlan, R., Bergami, A., Lang, R., Brambilla, E., Franciotta, D., Martinelli, V., Comi, G., Panina, P., Martino, G. (2000). Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. *Journal of neuroimmunology*. 111(1-2):86–92.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D, et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480):446–50.
- Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 8(Suppl2):S3.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., et al. (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 31:677–689.
- Gangarapu, V., Ince, A.T., Baysal, B., Kayar, Y., Kiliç, U., Gök, Ö., et al. (2015). Efficacy of rifaximin on circulating endotoxins and cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 27:840–845.
- Gao, B., Bataller, R. (2011). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. *Gastroenterology*, 141(5), 1572–1585.

- Gao, J., Gilliland, M.G., Owyang, C. (2014). Rifaximin, gut microbes and mucosal inflammation: unraveling a complex relationship. *Gut Microbes*, 5:571–575.
- Gautron, L., Lafon, P., Chaigniau, M., Tramu, G., Layé, S. (2002). Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience*, 112(3):717–29.
- Gattorno, M., Piccini, A., Lasigliè, D., Tassi, S., Brisca, G., Carta, S., Delfino, L., Ferlito, F., Pelagatti, M.A., Caroli, F., Buoncompagni, A., Viola, S., Loy, A., Sironi, M., Vecchi, A., Ravelli, A., Martini, A., Rubartelli, A. (2008). The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58(5):1505–15.
- Ge, D., You, Z. (2008). Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissues. *International archives of medicine*, 1(1):19.
- Geiger, J.R., Melcher, T., Koh, D.S., et al. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*, 15:193–204.
- Gerber, T., Schomerus, H. (2000). Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Drugs*, 60(6):1353–70.
- Gerok, W., Häussinger, D. (1984). [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Med Welt*, 35:28–34.
- Ghosh, M., Xu, Y., Pearse, D. (2015). Cyclic AMP is a key regulator of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1):1–14.
- Giacomo, F., Francesco, A., Michele, N., Oronzo, S., Antonella, F. (1993). Rifaximin in the treatment of hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Res*, 4:57–66.
- Gillis, J.C., Brogden, R.N. (1995). Rifaximin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in conditions mediated by gastrointestinal bacteria. *Drugs*, 49:467–484.
- Gimenez-Garzó, C., Urios, A., Agustí, A., et al. (2015). Is cognitive impairment in cirrhotic patients due to increased peroxynitrite and oxidative stress? *Antioxid Redox Signal*, 22(10):871–7.
- Giménez-Garzó, C., Garcés, J.J., Urios, A., et al. (2017). The PHES battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients. *PLoS One*, 12(2):e0171211.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005):841–845.
- Gluud LL, Vilstrup H, Morgan MY. (2016) Nonabsorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*, 64:908–922.
- Goldmann, J., Kwidzinski, E., Brandt, C., Mahlo, J., Richter, D., Bechmann, I. (2006). T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol*, 80:797–801.
- Gonzalez-García, I., Zhao, Y., Ju, S., Gu, Q., Liu, L., Kolls, J.K., Lu, B. (2009). IL-17 signaling-independent central nervous system autoimmunity is negatively regulated by TGF- β . *Journal of immunology*, 182(5):2665–71.
- Gonzalez-Usano, A., Cauli, O., Agustí, A., Felipe, V. (2014). Pregnenolone sulphate restores the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway and extracellular GABA in cerebellum and learning and motor coordination in hyperammonemic rats. *ACS Chem Neurosci*, 5(2):100–5.

Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., Sutter, J.L., Koren, O., Blekman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J.T., Spector, T.D., Clark, A.G., Ley, R.E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4):789-99.

Gordon, C., Wofsy, D. (1990). Effects of recombinant murine tumor necrosis factor-alpha on immune function. *Journal of immunology*, 144(5):1753-8.

Gordon N. (2007). The cerebellum and cognition. *Eur J Paediatr Neurol.*, 11: 232-234.

Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalstein, Y., Ben-Hur, T., Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*, 32(8-10):1106-1115.

Greve, J.W., Gouma, D.J., Soeters, P.B., Buurman, W.A. (1990). Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology*, 98:478-485.

Groeneweg, M., Quero, J.C., De Bruijn, I., Hartmann, I.J., Essink-Bot, M.L., Hop, W.C., Schalm, S.W. (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology*, 28:45-49.

Grover, V.P., Pavese, N., Koh, S.B., Wylezinska, M., Saxby, B.K., Gerhard, A., Forton, D.M., Brooks, D.J., Thomas, H.C., Taylor-Robinson, S.D. (2012). Cerebral microglial activation in patients with hepatitis C: in vivo evidence of neuroinflammation. *J Viral Hepat*, 19:e89-96.

Hadjihambi, A., Jalan, R. (2005). Hepatic Encephalopathy: New Treatments. *Clinical Liver Disease*, 5(5): 109-111.

Hakansson, A., Molin, G. (2011). Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*, 3(6):637-82.

Hall, J.A., Bouladoux, N., Sun, C.M., Wohlfert, E.A., Blank, R.B., Zhu, Q., et al. (2008). Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity*, 29(4):637-49.

Hamaguchi, M., Kojima, T., Takeda, N., Nakagawa, T., Taniguchi, H., Fujii, K., Omatsu, T., Nakajima, T., Sarui, H., Shimazaki, M., Kato, T., Okuda, J., Ida, K. (2005). The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med.*, 143(10): 722-728.

Hamm, R.J., Pike, B.R., O'dell, D.M., Lyeth, B.G., Jenkins, L.W. (1994). The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 11(2):187-96.

Hammerich, L., Tacke, F. (2014). Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clinical and experimental gastroenterology*, 7:297-306.

Hammond, R.S., Tull, L.E., And Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82:26-34.

Hanchar, H.J., Dodson, P.D., Olsen, R.W., Otis, T.S., Wallner, M. (2005). Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABAA receptor activity. *Nat Neurosci.*, 8:339-345.

Hanisch Uk, Kettenmann H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10:1387-1394.

Hardbower, D., Asim, M., Murray-Stewart, T., Casero, R., Verriere, T., Lewis, N., Chaturvedi, R., Piazuelo, B., Wilson, K. (2016). Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated polyamine metabolism in response to *Helicobacter pylori* infection. *Amino Acids*, 48(10):2375-88.

Hartmann, P., Chen, W.C., Schnabl, B. (2012). The intestinal microbiome and the leaky gut as therapeutic targets in alcoholic liver disease. *Front Physiol*, 3:402.

- Hashimoto, T., Cook, W.S., Qi, C., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., Rao, M.S. (2000) Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis. *J Biol Chem*, 275: 28918–28928.
- Häussinger, D. (2011). Chapter 1: Liver Regeneration and Partial Hepatectomy: Process and Prototype. *Liver Regeneration*, 1-16.
- Hawkins, R.A., Jessy, J., Mans, A.M., Chedid, A., DeJoseph, M.R. (1994). Neomycin reduces the intestinal production of ammonia from glutamine. *Adv Exp Med Biol*, 368:125–134.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to cocultured astrocytes. *Glia*, 19:13–26.
- He, X., Ji, G., Jia, W., Li, H. (2016). Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanism and Application of Metabolomics. *Int J Mol Sci*, 17(3):300.
- Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M.D., Gaztelu, J.M., Miñana, M.D., Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 10:3201–3209.
- Hernández-Rabaza, V., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V. (2015). Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, 12:195.
- Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., Felipo, V. (2016a). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of Neuroinflammation*, 13:41.
- Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., Llansola, M., Felipo, V. (2016b). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of neuroinflammation*, 13(1): 83.
- Hernandez-Viadel, M., Montoliu, C., Monfort, P., Canales, J.J., Erceg, S., Rowan, M., Ceccatelli, S., Felipo, V. (2003). Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in rat brain in vivo. *Neurochem. Int.*, 42:525–533.
- Hilsabeck, R.C., Perry, W., Hassanein, T.I. (2002). Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 35:440–446.
- Hirota, S.A. (2015). Understanding the Molecular Mechanisms of Rifaximin in the Treatment of Gastrointestinal Disorders--A Focus on the Modulation of Host Tissue Function. *Mini Rev Med Chem*, 16:206–217.
- Hodge, G.; Hodge, S. (2016). Steroid resistant CD8(+)CD28(null) nkt-like pro-inflammatory cytotoxic cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Front. Immunol.*, 7:617.
- Hoover, W.W., Gerlach, E.H., Hoban, D.J., Eliopoulos, G.M., Pfaller, M.A., Jones, R.N. (1993). Antimicrobial activity and spectrum of rifaximin, a new topical rifamycin derivative. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 16:111–8.
- Hosoi, T., Okuma, Y., Nomura, Y. (2002). The mechanisms of immune-to-brain communication in inflammation as a drug target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1(3):257-62.
- Hovens, I.B., Schoemaker, R.G., Van Der Zee, E.A., Absalom, A.R., Heineman, E., Van Leeuwen, B.L. (2014). Postoperative cognitive dysfunction: Involvement of neuroinflammation and neuronal functioning. *Brain Behav. Immun.*, 38:202–210.

- Huang, H.L., Wang, Y.J., Zhang, Q.Y., et al. (2012). Hepatoprotective Effects of Baicalein Against CCl₄-induced Acute Liver Injury in Mice. *World J Gastroenterol*, 18(45):6605-13.
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H., Waismann, A., Kuhlmann, C. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal*, 24 (4):1023–34.
- Hurwitz, A.A., Berman, J.W., Rashbaum, W.K., Lyman, W.D. (1993). Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res.*, 625:238–243.
- Hyman, J.M., Zilli, E.A., Paley, A.M., and Hasselmo, M.E. (2010). Working Memory Performance Correlates with Prefrontal-Hippocampal Theta Interactions but not with Prefrontal Neuron Firing Rates. *Front Integr Neurosci*, 4:2.
- Hyland, N.P., Cryan, J.F. (2016). Microbe-host interactions: influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Dev. Biol*, 417:182–187.
- Ilan Y. (2012). Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 18(21):2609-18.
- Imaizumi, T., Yoshida, H., Satoh, K. (2004). Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 11(1):15–21.
- Ivanov, I.I., De Frutos, R.L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe*, 4:337–349.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*, 21(29):8787-803.
- Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L.M., Li, N., Von Glehn, F., Yan, R., Patel, B., Mazzola, M.A., Liu, S., Glanz, B.L., Cook, S., Tankou, S., Stuart, F., Melo, K., Nejad, P., Smith, K., Topcuolu, B.D., Holden, J., Kivisakk, P., Chitnis, T., De Jager, P.L., Quintana, F.J., Gerber, G.K., Bry, L., Weiner, H.L. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.*, 7:12015.
- Jarrard Le. (1983). Selective hippocampal lesions and behavior: Effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci*. 97:873-889.
- Jia, L., Wu, C. (2014). The biology and functions of Th22 cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 841:209–30.
- Jiang, Q., Jiang, X.H., Zheng, M.H., Jiang, L.M., Chen, Y.P., Wang, L. (2008). Rifaximin versus nonabsorbable disaccharides in the management of hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20:1064–1070.
- Jiang, Q., Jiang, X.H., Zheng, M.H., Chen, Y.P. (2009). l-Ornithine l-aspartate in the management of hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*, 24:9–14.
- Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., Wang, X., Sun, B. (2011). Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology*, 54(3):900–9.
- Jiang, W., Wu, N., Wang, X., Chi, Y., Zhang, Y., Qiu, X., et al. (2015). Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*, 5:8096.
- Jiang, Z.D., Ke, S., Palazzini, E., Riopel, L., Dupont, H.L. (2000). In vitro activity and fecal concentration of rifaximin after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:2205-6.

- Jiang, Z.D., Dupont, H.L., La Rocco, M., Garey, K.W. (2010a). In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* to rifaximin and rifampin in 359 consecutive isolates at a university hospital in Houston, Texas. *J Clin Pathol*, 63:355–358.
- Jiang, Z.D., Ke, S., Dupont, H.L. (2010b). Rifaximin-induced alteration of virulence of diarrhoea-producing *Escherichia coli* and *Shigella sonnei*. *Int J Antimicrob Agents*, 35:278–281.
- Jones, E.A., Weissenborn, K. (1997). Neurology and the liver. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 63(3):279–93.
- Jones, B.A., Beamer, M., Ahmed, S. (2010). Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Molecular interventions*, 10(5):263–70.
- Johansson, M., Agusti, A., Llansola, M., Montoliu, C., Strömberg, J., Malinina, E., Ragagnin, G., Doverskog, M., Bäckström, T., Felipo, V. (2015). GR3027 antagonizes GABA A receptor-potentiating neurosteroids and restores spatial learning and motor coordination in rats with chronic hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309:G400–G409.
- Johansson, M., Strömberg, J., Ragagnin, G., Doverskog, M., Bäckström, T. (2016). GABAA receptor modulating steroid antagonists (GAMSA) are functional in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 160:98–105.
- Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*, 482:395–399.
- Jover, R., Compañ, L., Gutiérrez, A., Zapater, P., Pérez-Serra, J., Girona, E., Aparicio, J.R.R. Pérez-Mateo, M. (2003). Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*, 98(7):1599–604.
- Jover, R., Compañ, L., Gutiérrez, A., Lorente, M., Zapater, P., Poveda, M.J.J., Such, J., Pascual, S., Palazón, J.M.M., Carnicer, F., Ferrandis, F. and Pérez-Mateo, M. (2005). Clinical significance of extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*, 42(5):659–65.
- Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S., Suárez, I., Candela, A., Compañ, A., Esteban, A., et al. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, 43:1257–1266.
- Jover-Cobos, M., Khetan, V., Jalan, R. (2014). Treatment of hyperammonemia in liver failure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 17:105–110.
- Kahle, P., Saal, J.G., Schaudt, K., Zacher, J., Fritz, P., Pawelec, G. (1992). Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Annals of the rheumatic diseases*, 51(6):731–4.
- Kalambokis, G.N., Mouzaki, A., Rodi, M., Pappas, K., Fotopoulos, A., Xourgia, X., et al. (2012). Rifaximin improves systemic hemodynamics and renal function in patients with alcohol-related cirrhosis and ascites. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10:815–818.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., (2000). Principles of neural science (Ed 4. McGraw-hill New York).
- Keifer, J., Zheng, Z. (2010). AMPA receptor trafficking and learning. *Eur J Neurosci.*, 32(2):269–277.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., et al. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13:1173–1175.

- Khera, T.K., Copland, D.A., Boldison, J., Lait, P.J., Szymkowski, D.E., Dick, A.D., Nicholson, L.B. (2012). Tumour necrosis factor-mediated macrophage activation in the target organ is critical for clinical manifestation of uveitis. *Clinical and experimental immunology*, 168(2):165–77.
- Kim, J. M., Kim, D. H., Lee, Y., Park, S. J., & Ryu, J. H. (2014). Distinct roles of the hippocampus and perirhinal cortex in GABAA receptor blockade-induced enhancement of object recognition memory. *Brain Research*, 1552:17–25.
- Kim, M.T., Harty, J.T. (2014). Impact of Inflammatory Cytokines on Effector and Memory CD8+ T Cells. *Front Immunol.* 5: 295.
- Kimer, N., Krag, A., Møller, S., Bendtsen, F., Gluud, L.L. (2014). Systematic review with meta-analysis: the effects of rifaximin in hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther*, 40:123–32.
- Kimer, N., Pedersen, J.S., Tavenier, J., Christensen, J.E., Busk, T.M., Hobolth, L., et al. (2018). Rifaximin has minor effects on bacterial composition, inflammation and bacterial translocation in cirrhosis. A randomized trial. *J Gastroenterol Hepatol*, 33:307–314.
- King, C., Tangye, S.G., Mackay, C.R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*, 26:741–66.
- Kipnis, J. (2016). Multifaceted interactions between adaptive immunity and the central nervous system. *Science*, Vol. 353, Issue 6301, pp. 766–771.
- Kiyono, H., Mcghee, J.R., Wannemuehler, M.J., Michalek, S.M. (1982). Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *The Journal of experimental medicine*, 155:605–610.
- Klein M, Brouwer Mc, Angele B, Geldhoff M, Marquez G, Varona R, Häcker G, Schmetzer H, Häcker, H., Hammerschmidt, S., Van Der Ende, A., Pfister, H.W., Van De Beek, D., Koedel, U. (2014). Leukocyte attraction by CCL20 and its receptor CCR6 in humans and mice with pneumococcal meningitis. *PLoS One*, 9(4):e93057.
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., Mccullough, A.J., Sanyal, A.J. (2005). Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6):1313–21.
- Kleinewietfeld, M., Hafler, D. (2014). Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunological reviews*, 259(1):231–44.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 448(7152):484–7.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1):485–517.
- Kornerup, L.S., Gluud, L.L., Vilstrup, H., Dam, G. (2018). Update on the Therapeutic Management of Hepatic Encephalopathy. *Curr Gastroenterol Rep*, 20(5): 21.
- Korsrud, G.O., Grice, H.C., Mclaughlan, J.M. (1972). Sensitivity of several serum enzymes in detecting carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 22: 474–483.
- Kostic, A.D., Xavier, R.J., Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 146(6):1489–99.
- Kountouras, J., Billing, B.H., Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*, 65:305–311.

- Krieger, S., Jauss, M., Jansen, O., Theilmann, L., Geissler, M. and Krieger, D. (1996). Neuropsychiatric profile and hyperintense globus pallidus on T1-weighted magnetic resonance images in liver cirrhosis. *Gastroenterology*, 111(1):147–55.
- Krupa Dj, Thompson Jk, Thompson Rf. (1993). Localization of a memory trace in the mammalian brain. *Science*, 260:989–991.
- Krupa Dj, Thompson Rf. (1995). Inactivation of the superior cerebellar peduncle blocks expression but not acquisition of the rabbit's classically conditioned eye-blink response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:5097–5101.
- Kumar V., Deo M.G., And Ramalingaswami V. (1972). Mechanism of fatty liver in protein deficiency. An experimental study in the rhesus monkey. *Gastroenterology*, 62:445–451.
- Kunkel, E. J., Butcher, E. C. (2002). Chemokines and the Tissue-Specific Migration of Lymphocytes. *Immunity*, 16(1):1–4.
- Kunkel, E. J., Campbell, D. J., Butcher, E. C. (2010). Chemokines in Lymphocyte Trafficking and Intestinal Immunity. *Microcirculation*, 10(3–4):313–323.
- Labrousse, V. F., Costes, L., Aubert, A., Darnaudéry, M., Ferreira, G., Amédée, T., Layé, S. (2009). Impaired Interleukin-1 β and c-Fos Expression in the Hippocampus Is Associated with a Spatial Memory Deficit in P2X7 Receptor-Deficient Mice. *PLoS ONE*, 4(6):e6006.
- Lalor, P. F., Shields, P., Grant, A. J., Adams, D. H. (2002). Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunology and Cell Biology*, 80(1), 52–64.
- Ray, K. (2015). Leaky guts: intestinal permeability and NASH. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(3):123–123.
- Lamanna, A., Orsi, A. (1984). In vitro activity of rifaximin and rifampicin against some anaerobic bacteria. *Chemioterapia*, 3:365–7.
- Lan, R.Y., Salunga, T.L., Tsuneyama, K., Lian, Z.-X.X., Yang, G.-X.X., Hsu, W., Moritoki, Y., Ansari, A.A., Kemper, C., Price, J., Atkinson, J.P., Coppel, R.L., Gershwin, M.E. (2009). Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *Journal of autoimmunity*, 32(1):43–51.
- Lario, M., Muñoz, L., Ubeda, M., Borrero, M.-J.J., Martínez, J., Monserrat, J., Díaz, D., Alvarez- Mon, M., Albillos, A. (2013). Defective thymopoiesis and poor peripheral homeostatic replenishment of T-helper cells cause T-cell lymphopenia in cirrhosis. *Journal of hepatology*, 59(4):723–30.
- Le Champion, A., Gagnerault, M.-C.C., Auffray, C., Bécourt, C., Poitrasson-Rivière, M., Lallemand, E., Bienvenu, B., Martin, B., Lepault, F. and Lucas, B. (2009). Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood*, 114(9):1784–93.
- Llansola, M., Rodrigo, R., Monfort, P., Montoliu, C., Kosenko, E., Cauli, O., Piedrafita, B., El Mlili, N., Felipo, V. (2007). NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.*, 22(3–4):321–35.
- Llansola, M., Hernandez-Viadel, M., Erceg, S., Montoliu, C., Felipo, V. (2009). Increasing the function of the glutamate-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway increases the ability to learn a Y-maze task. *J Neurosci Res.*, 87: 2351–2355.
- Leclercq, I.A., Farrell, G.C., Schriemer, R., Robertson, G.R. (2002). Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol.*, 37(2):206–13.
- Ledeboer, A., Brevé, J.J., Poole, S., Tilders, F.J., Van Dam, A.M. (2000). Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*, 30(2):134–42.

- Leevy, C.B., Phillips, J.A. (2007). Hospitalizations during the use of rifaximin versus lactulose for the treatment of hepatic encephalopathy. *Dig Dis Sci*, 52(3):737-41.
- Leise, M.D., Poterucha, J.J., Kamath, P.S., Kim, W.R. (2014). Management of hepatic encephalopathy in the hospital. *Mayo Clin Proc*, 89:241–253.
- Le Moine, O., Marchant, A., De Groote, D., Azar, C., Goldman, M., & Deviere, J. (1995). Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 22:1436–1439
- Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaïss, C.A., Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 17(4):219-232.
- Lewis, D.E., Merched-Sauvage, M., Goronzy, J.J., et al. (2004). Tumor necrosis factor-alpha and CD80 modulate CD28 expression through a similar mechanism of T-cell receptor-independent inhibition of transcription. *J Biol Chem*, 279:29130–29138.
- Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci*, 102(31):11070-5.
- Liao, L.-M., Zhou, L.-X., Le, H.-B., Yin, J.-J., Ma, S.-H. (2012). Spatial working memory dysfunction in minimal hepatic encephalopathy: an ethology and BOLD-fMRI study. *Brain Res.*, 1445:62–72.
- Liao, W.-T., You, H.-L., Li, C., Chang, J.-G., Chang, S.-J., Chen, C.-J. (2015). Cyclic GMP-dependent protein kinase II is necessary for macrophage M1 polarization and phagocytosis via toll-like receptor 2. *Journal of Molecular Medicine*, 93(5):523–33.
- Liu, Q., Duan, Z.P., Ha, D.K., Bengmark, S., Kurtovic, J., Riordan, S.M. (2004). Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 39(5):1441-1449.
- Liu, S., Lizée, G., Lou, Y., Liu, C., Overwijk, W.W., Wang, G., Hwu, P. (2007). IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells. *International immunology*, 19(10):1213–21.
- Liu, Q.L., Zheng, H.Q., Chen, X.Y., Peng, Y.W., Huang, W.J., Li, X.B. et al. (2015). Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8(+) CD28(–) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol*. 12:708–718.
- Liu, R., Kang, J. D., Sartor, R. B., Sikaroodi, M., Fagan, A., Gavis, E. A., Zhou, H., Hylemon, P. B., Herzog, J. W., Li, X. (2020). Neuroinflammation in murine cirrhosis is dependent on the gut microbiome and is attenuated by fecal transplant. *Hepatology*, 71(2): 611-626.
- Lockwood, A.H., Murphy, B.W., Donnelly, K.Z., Mahl, T.C., Perini, S. (1993). Positron emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 18:1061–1068.
- Lockwood, A.H. (2000). “What’s in a name?” Improving the care of cirrhotics. *J. Hepatol.*, 32:859–861.
- Lodolce, J.P., Burkett, P.R., Koka, R.M., Boone, D.L., Ma, A. (2002). Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(6):429–39.
- Loguercio, C., Federico, A., De Girolamo, V., Ferrieri, A., Del Vecchio Blanco, C. (2003). Cyclic treatment of chronic hepatic encephalopathy with rifaximin. Results of a double-blind clinical study. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 49:53–62.
- Loof, T. G., Sohail, A., Bahgat, M. M., Tallam, A., Arshad, H., Akmatov, M. K., et al. (2018). Early Lymphocyte Loss and Increased Granulocyte/Lymphocyte Ratio Predict Systemic Spread of *Streptococcus pyogenes* in a Mouse Model of Acute Skin Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8:101.

- Lucas, K., Maes, M. (2013). Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.*, 48:190–204.
- Louveau, A., Smimov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., Harris, T.H., Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523:337–341.
- Lubberts, E., Schwarzenberger, P., Huang, W., Schurr, J.R., Peschon, J.J., Van Den Berg, W.B., Kolls, J.K. (2005). Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. *Journal of immunology*, 175(5):3360–8.
- Luckheeram, R., Zhou, R., Verma, A., Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012:1–12.
- Lunia, M.K., Sharma, B.C., Sharma, P., et al. (2014). Probiotics prevent hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a randomized controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 12:1003–8.
- Luster, A.D. (2001). Chemokines regulate lymphocyte homing to the intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 120:291–294.
- Luther, J., Garber, J. J., Khalili, H., Dave, M., Bale, S. S., Jindal, R., et al. (2015). Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1(2):222–232.e2.
- Ma, X., Shah, Y.M., Guo, G.L., Wang, T., Krausz, K.W., Idle, J.R., Gonzalez, F.J. (2007). Rifaximin is a gut-specific human pregnane X receptor activator. *J Pharmacol Exp Ther*, 322:391–398.
- Ma, L., Qin, J., Ji, H., Zhao, P., Jiang, Y. (2014). Tfh and plasma cells are correlated with hypergamma globulinaemia in patients with autoimmune hepatitis. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 34(3):405–15.
- Maccaferri, S., Vitali, B., Klinder, A., Kolida, S., Ndagijimana, M., Laghi, L., Calanni, F., Brigidi, P., Gibson, G.R., Costabile, A. (2010). Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother*, 65:2556–2565.
- Macdonald, H.R., Casanova, J.L., Maryanski, J.L. and Cerottini, J.C. (1993). Oligoclonal expansion of major histocompatibility complex class I-restricted cytolytic T lymphocytes during a primary immune response in vivo: direct monitoring by flow cytometry and polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine*, 177(5):1487–92.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc*, 62(1):67-72.
- Mackay, C.R., Marston, W.L., Dudler, L. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *The Journal of experimental medicine*, 171(3):801–17.
- Macleod, M.K.L., Clambey, E.T., Kappler, J.W., Marrack, P. (2009). CD4 memory T cells: what are they and what can they do? *Semin Immunol.*, 21(2): 53–61.
- Macpherson, A.J., Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews Immunology*, 4:478–485.
- Macpherson, A.J., Slack, E., Geuking, M.B., McCoy, K.D. (2009). The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. *Seminars in immunopathology*, 31:145–149.
- Maharshi, S., Sharma, B.C., Srivastava, S., Jindal, A. (2015). Randomised controlled trial of lactulose versus rifaximin for prophylaxis of hepatic encephalopathy in patients with acute variceal bleed. *Gut*, 64:1341–2.

- Maier, S.F., Goehler, L.E., Fleshner, M., Watkins, L.R. (1998). The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 840:289–300.
- Malarkey, D., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., Maronpot, R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 27-34.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I., M. (2013). *Inmunología*, Saunders. 8th Edition, Elsevier.
- Maly, K., Schirmer, M. (2015). The story of CD4+ CD28- T cells revisited: solved or still ongoing? *J Immunol Res.*, 2015:348746.
- Man, S., Ubogu, E.E., Ransohoff, R.M. (2007). Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol.*, 17(2):243-50.
- Mandayam, S., Mazen Jamal, S., Morgan, T.R. (2004). Epidemiology of Alcoholic Liver Disease. *Semin Liver Dis*, 24(3): 217-232.
- Mandrekar, P., Ambade, A., Lim, A., Szabo, G., Catalano, D. (2011). An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 54:2185-2197.
- Mangas-Losada, A. (2017a). Caracterización de los cambios en el inmunofenotipo asociados a la aparición de la encefalopatía hepática mínima en pacientes cirróticos. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.
- Mangas-Losada, A., García-García, R., Urios, A., Escudero-García, D., Tosca, J., Giner-Durán, R., Serra, M.A., Montoliu, C., Felipo, V. (2017b). Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD4+CD28-, Th22 and Tfh and B lymphocytes. *Sci Rep*, 7(1):6683.
- Mangas-Losada, A., García-García, R., Leone, P., Ballester, M.P., Cabrera-Pastor, A., Urios, A., Gallego, J.J., Martínez-Pretel, J.J., Giménez-Garzó, C., Revert, F., Escudero-García, D., Tosca, J., Ríos, M.P., Montón, C., Durbán, L., Aparicio, L., Montoliu, C., Felipo, V. (2019). Selective improvement by rifaximin of changes in the immunophenotype in patients who improve minimal hepatic encephalopathy. *J Transl Med*, 17(1):293.
- Manning, R.T., Delp, M. (1958). Management of hepatocerebral intoxication. *N Engl J Med*, 258:55–62.
- Marcaggi, P., Coles, J.A. (2001). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog. Neurobiol.* 64:157–183.
- Marchese, A., Salerno, A., Pesce, A., Debbia, E.A., Schito, G.C. (2000). In vitro activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile* and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species. *Chemotherapy*, 46:253–266.
- Marchi, M., Raiteri, M. (1996). Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of “impaired” cholinergic presynaptic function. *J. Neurochem.*, 67:1974–1981.
- Martin, L.A., Goldowitz, D., Mittleman, G. (2003). The cerebellum and spatial ability: dissection of motor and cognitive components with a mouse model system. *Eur J Neurosci.*, 18:2002-2010.
- Martínez-Hernández, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, 195:1356–1358.
- Mas, A., Rodés, J., Sunyer, L., et al. (2003). Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. *J Hepatol*, 38:51–8.

- Massa, P., Vallerino, E., Dodero, M. (1993). Treatment of hepatic encephalopathy with rifaximin: double-blind, double dummy study versus lactulose. *Eur J Clin Res*, 4:7–18.
- Matyash, V., Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.*, 63: 2–10.
- Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.H., Gavrilova, O., Ward, J.M., Brewer, B. J.R., Reitman, M.L., Gonzalez, F.J. (2003). Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest.*, 111(5): 737–747.
- Mcclain, C. J., & Cohen, D. A. (1989). Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *HEPATOLOGY*, 9:349–351.
- Mclean, A.E., Mclean, E.K. (1966). The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (ddt) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem J*, 100: 564–571.
- Mcdermott, M.R., Bienenstock, J. (1979). Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol*, 122:1892–1898.
- Mcginley, A.M., Sutton, C.E., Edwards, S.C., et al. (2020). Interleukin-17A Serves a Priming Role in Autoimmunity by Recruiting IL-1 β -Producing Myeloid Cells that Promote Pathogenic T Cells. *Immunity*, 52:342-356.e6.
- Mehal, W.Z. (2013). The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(11):637-44.
- Mencarelli, A., Migliorati, M., Barbanti, M., Cipriani, S., Palladino, G., Distrutti, E., Renga, B., Fiorucci, S. (2010). Pregnane-X-receptor mediates the anti-inflammatory activities of rifaximin on detoxification pathways in intestinal epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, 80:1700–1707.
- Mencarelli, A., Renga, B., Palladino, G., Claudio, D., Ricci, P., Distrutti, E., Barbanti, M., Baldelli, F., Fiorucci, S. (2011). Inhibition of NF- κ B by a PXR-dependent pathway mediates counter-regulatory activities of rifaximin on innate immunity in intestinal epithelial cells. *Eur J Pharmacol*, 668:317–324.
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J., Cimadevilla, J.M., Arias, J.L. (2008). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res.*, 188:32–40.
- Middeldorp, J., Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.*, 93:421–43.
- Miglio, F., Valpiani, D., Rossellini, S.R., Ferrieri, A. (1997). Rifaximin, a non-absorbable rifamycin, for the treatment of hepatic encephalopathy. A double-blind, randomised trial. *Curr Med Res Opin*, 13:593–601.
- Milosevic, I., A. Vujovic, A. Barac, M. Djelic, M. Korac, A. Radovanovic Spurnic, I. Gmizic, O. Stevanovic, V. Djordjevic And N. Lekic (2019). "Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: a review of the literature. *International journal of molecular sciences*, 20(2): 395.
- Mínguez, B., García-Pagán, J.C., Bosch, J., Turnes, J., Alonso, J., Rovira, A., Córdoba, J. (2006). Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 43:707–714.
- Moens, L., Tangye, S.G. (2014). Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL- 21 Takes Center Stage. *Frontiers in immunology*, 5(5):65.
- Mohammad, R.A., Regal, R.E., Alaniz, C. (2012). Combination therapy for the treatment and prevention of hepatic encephalopathy. *Ann Pharmacother*, 46(11):1559–1563.

Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M., Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur. J. Neurosci.*, 25:2103–2111.

Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M., Del Olmo, J.A., Urios, A., Rodrigo, J.M., Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol.*, 43(3):272-279.

Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V. (2015). Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunol Neuroinflamm.*, 2:138–44.

Morris Rg.M., Frey U. (1997). Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 352:1489–1503.

Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., O'keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.*, 297:681-683.

Morgan, M.H., Read, A.E., Speller, D.C. (1982). Treatment of hepatic encephalopathy with metronidazole. *Gut*, 23:1–7.

Mostafa, T., Badra, G., Abdallah, M. (2015). The efficacy and the immunomodulatory effect of rifaximin in prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic Egyptian patients. *Turk J Gastroenterol*, 26:163–169.

Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., Curotto De Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *The Journal of clinical investigation*, 115:1923–1933.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317:256–260.

Mullen, K.D., Sanyal, A.J., Bass, N.M., et al. (2014). Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 12:1390–7.

Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., Lehmann, H. (2002). Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. *Learn. Mem.*, 9:49–57.

Murata, M., Nabeshima, S., Maeda, N., Nakashima, H., Kashiwagi, S., & Hayashi, J. (2002). Increased frequency of IFN- γ -producing peripheral CD8⁺ T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, 67(2):162–170.

Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A.D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M.R., Sayegh, M.H., Khoury, S.J. (2003). Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest.*, 112(7):1037-48.

Nakajima, T., Kamijo, Y., Tanaka, N., Sugiyama, E., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Fukushima, Y., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Aoyama, T. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor- α protects against alcohol-induced liver damage. *Hepatology*, 40(4):972–980.

Nakamura, N., Lin, H.C., Mcsweeney, C.S., Mackie, R.I., Gaskins, H.R. (2010). Mechanisms of microbial hydrogen disposal in the human colon and implications for health and disease. *Annual review of food science and technology*, 1:363-95.

Nave, K.A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 468(7321):244–252.

National Cancer Institute. (1976). Report on the carcinogenesis bioassay of chloroform (CAS No. 67-66-3). *Carcinogenesis, Technical report series*. Bethesda, MD: US Department of Health, Education, and Welfare, National Institute of Health. http://ntp.Niehs.Nih.Gov/ntp/htdocs/lt_rpts/trchloroform.pdf

- Nemeth, E., Baird, A.W., O'farrelly, C. (2009). Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol*, 31(3):333-43.
- Netea, M.G., Joosten, L.A., Latz, E., Mills, K.H., Natoli, G., Stunnenberg, H.G., O'Neill, L.A., Xavier, R.J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352(6284):aaf1098–aaf1098.
- Neuman, M., Maor, Y., Nanau, R., Melzer, E., Mell, H., Opris, M., Cohen, L. and Malnick, S. (2015). Alcoholic Liver Disease: Role of Cytokines. *Biomolecules*, 5(3):2023-34.
- Nguyen, K., D'mello, C., Le, T., Urbanski, S., Swain, M.G. (2012). Regulatory T cells suppress sickness behaviour development without altering liver injury in cholestatic mice. *Journal of hepatology*, 56(3):626–31.
- Nihei, M. K., & Guilarte, T. R. (2001). Molecular Changes in Glutamatergic Synapses Induced by Pb2+: Association with Deficits of LTP and Spatial Learning. *NeuroToxicology*, 22(5):635–643.
- Ni, Y., Teng, T., Li, R., et al. (2017). TNF α alters occludin and cerebral endothelial permeability: Role of p38MAPK. *PloS one*, 12(2):e0170346.
- Ní Chasaide, C., Lynch, M.A. (2020). The role of the immune system in driving neuroinflammation. *Brain Neurosci Adv*, 4:2398212819901082.
- Niess, J.H., Adler, G. (2010). Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *J Immunol*, 184:2026–2037.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308:1314–18.
- Noack, M., Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews*, 13(6):668–77.
- Norenberg, M.D., Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 161:303–310.
- O'farrelly, C., Crispe, I.N. (1999). Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system. *Immunol Today*, 20(9):394-8.
- O'keefe, J., Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. *Oxford University Press, New York*.
- Oliveri, M., Torriero, S., Koch, G., Salerno, S., Petrosini, L., Caltagirone, C. (2007). The role of transcranial magnetic stimulation in the study of cerebellar cognitive function. *Cerebellum*, 6: 95-101.
- Olson, J.K., Miller, S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol*, 173:3916–3924.
- Olson, J. C. (2016). Acute-on-chronic and Decompensated Chronic Liver Failure. *Critical Care Clinics*, 32(3):301–309.
- Olton, D.S., Becker, J.T., Handelmann, E. (1979). Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci.*, 2:313-366.
- Opp, M.R., Smith, E.M., Hughes, T.K. (1995). Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep. *Journal of neuroimmunology*, 60(1-2)165–8.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.-P.P., Wang, G., Qi, C.-F.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akillesh, S., Roopenian, D.C., Morse, H.C., Lipsky, P.E., Leonard, W.J. (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *Journal of immunology*, 173(9):5361–71.

- Paik, Y.H., Lee, K.S., Han, K.H., et al. (2005). Comparison of rifaximin and lactulose for the treatment of hepatic encephalopathy: a prospective randomized study. *Yonsei Med J*, 46:399–407.
- Paolella, G., Mandato, C., Pierri, L., Poeta, M., Di Stasi, M., Vajro, P. (2014). Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 20(42):15518–31.
- Pan, W., Stone, K.P., Hsuehou, H., Manda, V.K., Zhang, Y., Kastin, A.J. (2011). Cytokine Signaling Modulates Blood-Brain Barrier Function. *Curr Pharm Des.*, 17(33): 3729–3740.
- Papadakis, K.A., Targan, S.R. (2000). The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*, 6:303–313.
- Paquet, K.J., Kamphausen, U. (1975). The carbon-tetrachloride-hepatotoxicity as a model of liver damage. First report: long-time biochemical changes. *Acta Hepatogastroenterol*, 22: 84–88
- Patel, R.M., Denning, P.W. (2013). Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin Perinatol*, 40(1):11–25.
- Patidar, K.R., Bajaj, J.S. (2015). Covert and Overt Hepatic Encephalopathy: Diagnosis and Management. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 13(12): 2048–2061.
- Paulissen, S., Hamburg, J., Dankers, W., Lubberts, E. (2015). The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 74(1):43–53.
- Pavlov, V.A., Tracey, K.J. (2015). Neural circuitry and immunity. *Immunol. Res.*, 63:38–57.
- Pedretti, G., Calzetti, C., Missale, G., Fiaccadori, F. (1991). Rifaximin versus neomycin on hyperammonemia in chronic portal systemic encephalopathy of cirrhotics: a double-blind, randomized trial. *Ital J Gastroenterol*, 23:175–178.
- Pérez Del Pulgar, S., Pizcueta, P., Engel, P., & Bosch, J. (2000). Enhanced monocyte activation and hepatotoxicity in response to endotoxin in portal hypertension. *J Hepatol*, 32:25–31.
- Petranovic, D., Pilcic, G., Valkovic, T., et al. (2014). Perforin- and granulysin-mediated cytotoxicity and interleukin 15 play roles in neurocognitive impairment in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Med Hypotheses*, 83:122–126.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G. (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*, 101(4):815–850.
- Poh, Z., Chang, P.E. (2012). A current review of the diagnostic and treatment strategies of hepatic encephalopathy. *Int J Hepatol*, 2012:480309.
- Ponziani, F.R., Gerardi, V., Pecere, S., D'aversa, F., Lopetuso, L., Zocco, M.A., Pompili, M., Gasbarrini, A. (2015). Effect of rifaximin on gut microbiota composition in advanced liver disease and its complications. *World J Gastroenterol*, 21(43):12322–33.
- Ponziani, F.R., Scaldaferri, F., Petito, V., Paroni Sterbini, F., Pecere, S., Lopetuso, L.R., Palladini, A., Gerardi, V., Masucci, L., Pompili, M., et al. (2016). The Role of Antibiotics in Gut Microbiota Modulation: The Eubiotic Effects of Rifaximin. *Dig Dis*, 34:269–278.
- Ponziani, F.R., Zocco, M.A., D'aversa F., Pompili, M., Gasbarrini, A. (2017). Eubiotic properties of rifaximin: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation. *World J Gastroenterol*, 23(25):4491–4499.
- Pikor, N.B., Prat, A., Bar-Or, A., Gommerman, J.L. (2016). Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front Immunol.*, 6:657.

- Piedrafita, B., Cauli, O., Montoliu, C., Felipo, V. (2007) The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. *Learn Mem.*, 14: 254-258.
- Pound, A.W., Horn, L. Lawson, T.A. (1973). Decreased toxicity of dimethylnitrosamine in rats after treatment with carbon tetrachloride. *Pathology*, 5: 233-242.
- Power, S.E., O'toole, P.W., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr*, 111(3):387-402.
- Prasad, S., Dhiman, R.K., Duseja, A., Chawla, Y.K., Sharma, A., Agarwal, R. (2007). Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 45:549-559.
- Pratap Mouli, V., Benjamin, J., Bhushan Singh, M., et al. (2015). Effect of probiotic VSL#3 in the treatment of minimal hepatic encephalopathy: a non-inferiority randomized controlled trial. *Hepatol Res*, 45(8):880-889.
- Puca, F.M., Antonaci, F., Panella, C., Guglielmi, F.W., Barone, M., Francavilla, A., Cerutti, R. (1989). Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta Neurol. Scand.*, 79:280-287.
- Qamar, A.A. (2015). Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Cirrhosis. *J Clin Gastroenterol*, 49 Suppl 1:S28-32
- Racanelli, V., Rehmann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*, 43(S1), S54-S62.
- Raeber, M. E., Zurbuchen, Y., Impellizzieri, D., & Boyman, O. (2018). The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunological Reviews*, 283(1):176-193.
- Rahimi, R.S., Singal, A.G., Cuthbert, J.A., Rockey, D.C. (2014). Lactulose vs polyethylene glycol 3350: electrolyte solution for treatment of overt hepatic encephalopathy. The HELP randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*, 174:1727-1733.
- Ramirez, M., Fernandez, R., Malnic, G. (1999). Permeation of NH₃/NH₄⁺ and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflugers Arch*. 438:508-515.
- Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 3:569-581.
- Rao, M.S., Reddy, J.K. (2004). PPAR in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology*, 40(4):783-786.
- Ransohoff, R.M., Cardona, A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321):253-262.
- Ransohoff, R.M., Brown, M. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.*, 122(4):1164-1171.
- Ransohoff, R.M., Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 12:623-635.
- Rath, C.M., Dorrestein, P.C. (2012). The bacterial chemical repertoire mediates metabolic exchange within gut microbiomes. *Curr Opin Microbiol*, 15(2):147-54.
- Raveney, B., Copland, D., Calder, C., Dick, A., Nicholson, L. (2010). TNFR1 signalling is a critical checkpoint for developing macrophages that control of T-cell proliferation. *Immunology*, 131(3):340-9.

- Rawlins, J.N.P., Olton, D.S. (1982). The septohippocampal system and cognitive mapping. *Behav Brain Res.*, 5:331-358.
- Ray, K. (2015). Leaky guts: intestinal permeability and NASH. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(3):123-123.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., et al. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*, 10:514-523.
- Rehnström, S., Simert, G., Hansson, J.A., Johnson, G., Vang, J. (1977). Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scand J Gastroenterol*, 12:305-311.
- Reiser, J., Banerjee, A. (2016). Effector, memory, and dysfunctional CD8(+) T cell fates in the antitumor immune response. *J Immunol Res*, 2016: 8941260.
- Ridlon, J.M., Alves, J.M., Hylemon, P.B., Bajaj, J.S. (2013). Cirrhosis, bile acids and gut microbiota: unraveling a complex relationship. *Gut Microbes*, 4:382-387.
- Riordan, A. J., Schaler, A. W., Fried, J., Paine, T. A., & Thornton, J. E. (2018). Estradiol and luteinizing hormone regulate recognition memory following subchronic phencyclidine: Evidence for hippocampal GABA action. *Psychoneuroendocrinology*, 91:86-94.
- Robinson, M.W., Harmon, C., O'farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*, 13(3):267-76.
- Rockey, D.C., Vierling, J.M., Mantry, P, et al. (2014). Randomized, double-blind, controlled study of glycerol phenylbutyrate in hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 59:1073-1083.
- Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compan A, Saez-Valero J, Erceg S, Felipo V. (2005). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience*, 130:435-443
- Rodrigo, R., Erceg, S., Rodriguez-Díaz, J., Saez-Valero, J., Piedrafita, B., Suarez, I., Felipo, V. (2007). Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J. Neurochem.*, 102:51-64.
- Rodrigo, R., Felipo, V. (2007). Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. *Front. Biosci.*, 12:883-890.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J.M., Felipo, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2):675-684.
- Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., Del Olmo, J.A., Ramírez, M., Rey, R., De Madaria, E., Montoliu, C., Nuñez, D., Flavia, M., Compañ, L., Rodrigo, J.M., Felipo V. (2007). Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 45:879-885.
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P.I., Godneva, A., Kalka, I.N., Bar, N., Shilo, S., Lador, D., Vila, A.V., Zmora, N., Pevsner-Fischer, M., Israeli, D., Kosower, N., Malka, G., Wolf, B.C., Avnit-Sagi, T., Lotan-Pompan, M., Weinberger, A., Halpern, Z., Carmi, S., Fu, J., Wijmenga, C., Zhemakova, A., Elinav, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Segal E Nature*, 555(7695):210-215.
- Roughneen, P.T., Gouma, D.J., Kulkarni, A.D., Fanslow, W.F., Rowlands, B.J. (1986). Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage. *J. Surg. Res.*, 41:113-125.

- Rougier, H., Milota, S., Rodrigo, R., Gherase, M., Sarcina, L., Moldovan, O., Zilhão, J., Constantin, S., Franciscus, R.G., Zollkofer, C.P.E., et al. (2007). Peștera cu Oase 2 and the cranial morphology of early modern Europeans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:1165–1170.
- Rummel, C., Sachot, C., Poole, S., Luheshi, G.N. (2006). Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(5):R1316–R1326.
- Rutz, S., Eidenschenk, C., Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological Reviews*, 252(1):116–32.
- Salix Pharmaceuticals, Inc. Xifaxan® (rifaximin) tablets [package insert]. Raleigh, NC: Salix Pharmaceuticals, Inc., 2014.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754): 708–12.
- Sallusto, F., Impellizzieri, D., Basso, C., et al. (2012). T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev*, 248:216–227.
- Sampson, T.R., Mazmanian, S.K. (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe*, 17:565–576.
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Ouwehand, A.C., Reid, G., Salminen, S., Cabana, M.D, et al. (2016). Probiotic use in at-risk populations. *J Am Pharm Assoc*, 56(6):680–6.
- Sanderson, D., Good, M.A., Seeburg, P.H. (2008). The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Prog Brain Res.*, 169:159–178.
- Sanyal, A., Mullen, K.D., Bass, N.M., et al. (2012). Rates of commonly occurring infections in cirrhosis patients remain stable during long-term rifaximin treatment. *J Hepatol*, 56: S255–6.
- Sarem, M., Znaidak, R., Macías, M., Rey, R. (2006). Las células estrelladas del hígado: su importancia en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterología y Hepatología*, 29(2):93–101.
- Sarkola, T., Eriksson, C.J. (2001). Effect of 4-methylpyrazole on endogenous plasma ethanol and methanol levels in humans. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(4):513–6.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134:577–594.
- Scarpellini, E., Giorgio, V., Gabrielli, M., Filoni, S., Vitale, G., Tortora, A., Ojetti, V., Gigante, G., Fundarò, C., Gasbarrini, A. (2013). Rifaximin treatment for small intestinal bacterial overgrowth in children with irritable bowel syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17:1314–1320.
- Scarpignato, C., Pelosini, I. (2005). Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. *Chemotherapy*, 51 Suppl 1:36–66.
- Scarpignato, C., Pelosini, I. (2006). Experimental and clinical pharmacology of rifaximin, a gastrointestinal selective antibiotic. *Digestion*, 73 Suppl 1:13–27.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(5):878–88.
- Schmahmann, J.D. (1991). An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. *Arch Neurol.*, 48:1178–1187.
- Scholz, C., Patton, K.T., Anderson, D.E., Freeman, G.J., Hafler, D.A. (1998). Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *Journal of immunology*, 160(3):1532–8.

- Schomerus, H., Hamster, W. (2001). Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metab. Brain. Dis.*, 16:37–41.
- Schrezenmeir, J., De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73(2 Suppl):361S–4S.
- Schrodt, C., Mchugh, E.E., Gawinowicz, M.A., Dupont, H.L., Brown, E.L. (2013). Rifaximin-mediated changes to the epithelial cell proteome: 2-D gel analysis. *PLoS One*, 8:e68550.
- Schultz, V., Lowenstein, J.M. (1978). The purine nucleotide cycle. Studies of ammonia production and interconversions of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides by rat brain in situ. *J. Biol. Chem.* 253:1938–1943.
- Schulz, C., Schütte, K., Vilchez-Vargas, R., et al. (2019). Long-Term Effect of Rifaximin with and without Lactulose on the Active Bacterial Assemblages in the Proximal Small Bowel and Faeces in Patients with Minimal Hepatic Encephalopathy. *Dig Dis*, 37:161–169.
- Schutyser, E., Struyf, S., Van Damme, J. (2003). The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & growth factor reviews*, 14(5):409–26.
- Sherlock, S., Summerskill, W.H.J., White, L., Phear, E. (1954). Portal-systemic encephalopathy neurological complications of liver disease. *The Lancet*, 264:453–457.
- Sharma, P., Sharma, B.C., Puri, V., Sarin, S.K. (2008). Minimal hepatic encephalopathy in patients with extrahepatic portal vein obstruction. *Am. J. Gastroenterol.*, 103:1406–1412.
- Sharma, B.C., Sharma, P., Lunia, M.K., Srivastava, S., Goyal, R., Sarin, S.K. (2013). A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol*, 108:1458–63.
- Sharon, G., Sampson, T.R., Geschwind, D.H., Mazmanian, S.K. (2016). The central nervous system and the gut microbiome. *Cell*, 167:915–932.
- Shaw, S.K., Brenner, M.B. (1995). The beta 7 integrins in mucosal homing and retention. *Semin Immunol*, 7:335–342.
- Shawcross, D.L., Davies, N.A., Williams, R., Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol*, 40:247–254.
- Shawcross, D.L., Wright, G., Olde Damink, S.W., Jalan, R. (2007). Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.*, 22(1):125–38.
- Shi, C., Pamer, E. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11(11): 762–74.
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim.*, 49(1 Suppl):4–11.
- Siapas, A.G., Lubenov, E.V., and Wilson, M.A. (2005). Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron*, 46:141–151.
- Slater, T.F. (1981) Activation of carbon tetrachloride: chemical principles and biological significance. In: *McBrien D.C.H., Slater T.F. (Eds.), Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*, Academic Press, London, pp. 243–270.
- Slowik, A., Ciećko-Michalska, I., Bogdał, J., Szczudlik, A. (2001). The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy. *Prz. Lek.*, 58:1059–1062.

- Smith, J.B., McIntosh, G.H., Morris, B. (1970). The traffic of cells through tissues: a study of peripheral lymph in sheep. *J Anat*, 107:87–100.
- Smith, K. (2010). Neuroscience: settling the great glia debate. *Nature*, 468(7321):160–162.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., et al. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341(6145):569–73.
- Snider, R.S., Maiti, A., Snider, S.R. (1976). Cerebellar pathways to ventral midbrain and nigra. *Exp Neurol*. 53:714-728.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, 119(1):7–35.
- Soldi, S., Vasileiadis, S., Uggeri, F., Campanale, M., Morelli, L., Fogli, M.V., Calanni, F., Grimaldi, M., Gasbarrini, A. (2015). Modulation of the gut microbiota composition by rifaximin in non-constipated irritable bowel syndrome patients: a molecular approach. *Clin Exp Gastroenterol*, 8:309–325.
- Sonnenburg, E.D., Sonnenburg, J.L. (2014). Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab*, 20(5):779-786.
- Steffen, R., Sack, D.A., Riopel, L., et al. (2003). Therapy of travelers' diarrhea with rifaximin on various continents. *Am J Gastroenterol*. 98:1073–8.
- Steindl, P.E., Coy, D.L., Finn, B., Zee, P.C., Blei, A.T. (1996). A low-protein diet ameliorates disrupted diurnal locomotor activity in rats after portacaval anastomosis. *Am. J. Physiol.*, 271:G555-560.
- Streeter, P.R., Berg, E.L., Rouse, B.T., Bargatze, R.F., Butcher, E.C. (1988). A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature*, 331:41–46.
- Strioga, M., Pasukoniene, V., Characiejus, D. (2011). CD8(+) CD28(–) and CD8(+) CD57(+) T cells and their role in health and disease. *Immunology*, 134: 17–32.
- Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol*, 159:1739–1745.
- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine*, 204:1775–1785.
- Sun, M.F., Shen, Y.Q. (2018). Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease. *Ageing Research Reviews*, 45, 53–61.
- Suraweera, D., Sundaram, V., Saab, S. (2016). Evaluation and management of hepatic encephalopathy: Current status and future directions. *Gut and Liver*:10(4), 509–519.
- Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., Saito, Y., Nakayama, T., Grusby, M.J., Iwamoto, I., Nakajima, H. (2008). Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(6):1369–79.
- Swaminathan, M., Ellul, M.A., Cross, T.J.S. (2018). Hepatic encephalopathy: current challenges and future prospects. *Hepat Med*, 10:1–11.
- Szabo, G. (2015). Gut–Liver Axis in Alcoholic Liver Disease. *Gastroenterology*, 148(1):30–36.
- Takeda, S., Sato, N., Morishita, R. (2014). Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front Aging Neurosci*, 6:171.

Tannapfel, A., Denk, H., Dienes, H.-P., Langner, C., Schirmacher, P., Trauner, M., Flottrahmel, B. (2011). Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Archiv*, 458(5), 511–523.

Tanida, M., Yamano, T., Maeda, K., Okumura, N., Fukushima, Y., Nagai, K. (2005). Effects of intraduodenal injection of *Lactobacillus johnsonii* La1 on renal sympathetic nerve activity and blood pressure in urethane-anesthetized rats. *Neurosci. Lett.*, 389:109–114.

Taoro-González, L., Arenas, Y.M., Cabrera-Pastor A., Felipo V. (2018). Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *J Neuroinflammation*, 15(1):36.

Taoro-González, L., Cabrera-Pastor A., Sancho-Alonso, M., Arenas, Y.M., Meseguer-Estornell, F., Balzano, T., Elmlili, N., Felipo V. (2019). Differential role of interleukin-1 β in neuroinflammation-induced impairment of spatial and nonspatial memory in hyperammonemic rats. *FASEB J.*, 33(9):9913–9928.

Taylor, D.N., Bourgeois, A.L., Ericsson, C.D., Steffen, R., Jiang, Z.D., Halpern, J., Haake, R., Dupont, H.L. (2006). A randomized, double-blind, multicenter study of rifaximin compared with placebo and with ciprofloxacin in the treatment of travelers' diarrhea. *Am J Trop Med Hyg*, 74:1060–1066.

Taylor, D.N., McKenzie, R., Durbin, A., Carpenter, C., Haake, R., Bourgeois, A.L. (2008). Systemic pharmacokinetics of rifaximin in volunteers with shigellosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 52:1179–81.

Tenorio-Laranga, J., Montoliu, C., Urios, A., Hernández-Rabaza, V., Ahabrach, H., García-Horsman, J.A., Felipo, V. (2015). The expression levels of prolyl oligopeptidase responds not only to neuroinflammation but also to systemic inflammation upon liver failure in rat models and cirrhotic patients. *J Neuroinflammation*, 12:183.

Thompson, K., Maltby, J., Fallowfield, J., Mcaulay, M., Millward-Sadler, H., Sheron, N. (1998). Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*, 28(6):1597–606.

Tilg, H., Diehl, A.M. (2000). Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.*, 343:1467–1476.

Todd, D.J., Greiner, D.L., Rossini, A.A., Mordes, J.P., Bortell, R. (2001). An atypical population of NK cells that spontaneously secrete IFN-gamma and IL-4 is present in the intraepithelial lymphoid compartment of the rat. *Journal of immunology*, 167(7):3600–9.

Tracey, K.J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F., Cerami, A. (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, 330(6149):662–4.

Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151.

Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87:1327–1338

Tulunay, A., Yavuz, S., Direskeneli, H., Eksioğlu-Demiralp, E. (2008). CD8+CD28-, suppressive T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 17(7):630–7.

Turkmen, S., Lundgren, P., Birzniece, V., Zingmark, E., Backstrom, T., Johansson, I.M. (2004). 3 β -20 β -dihydroxy-5 α -pregnane (UC1011) antagonism of the GABA potentiation and the learning impairment induced in rats by allopregnanolone. *Eur J Neurosci*, 20:1604–1612.

Uesugi, T., Froh, M., Arteel, G.E., Bradford, B.U., Thurman, R.G. (2001). Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology*, 34:101–108.

- Valdes, A.M., Walter, J., Segal, E., Spector, T.D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, 361:k2179.
- Vallejo, A.N., Weyand, C.M., Goronzy, J.J.J. (2004). T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends in molecular medicine*, 10 (3):119–24.
- Vallières, F., Girard, D. (2013). IL-21 enhances phagocytosis in mononuclear phagocyte cells: identification of spleen tyrosine kinase as a novel molecular target of IL-21. *Journal of immunology*, 190(6):2904–12.
- Varma, T.K., Toliver-Kinsky, T.E., Lin, C.Y., Koutrouvelis, A.P., Nichols, J.E., Sherwood, E.R. (2001). Cellular mechanisms that cause suppressed gamma interferon secretion in endotoxintolerant mice. *Infection and immunity*, 69(9):5249–63.
- Venturini, A.P., Marchi, E. (1986). In vitro and in vivo evaluation of L/105, a new topical intestinal rifamycin. *Chemioterapia*, 5:257–62.
- Vezina, P., Kim, J.H. (1999). Metabotropic glutamate receptors and the generation of locomotor activity: interactions with midbrain dopamine. *Neurosci Biobehav Rev.*, 23:577-589.
- Vezzani, A. Ravizzi, T., Balosso, S., Aronica, E. (2008). Glia as a source of cytokines: Implications for neuronal excitability and survival. *Epilepsia*, 49 (Suppl. 2):24–32.
- Voirin, A.C., Perek, N., Roche, F. (2020). Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells in vitro BBB model. *Brain Res*, 1730:146647.
- Viramontes Hörner, D., Avery, A., Stow, R. (2017). The effects of probiotics and symbiotics on risk factors for hepatic encephalopathy: a systematic review. *J Clin Gastroenterol*, 51(4):312–323.
- Vitali, B., Turrone, S., Dal Piaz, F., Candela, M., Wasinger, V., Brigidi, P. (2007). Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07. *Res Microbiol*, 158:355–362.
- Vitali, B., Turrone, S., Serina, S., Sosio, M., Vannini, L., Candela, M., Guerzoni, M.E., Brigidi, P. (2008). Molecular and phenotypic traits of in-vitro-selected mutants of *Bifidobacterium* resistant to rifaximin. *Int J Antimicrob Agents*, 31:555–560.
- Vitali, B., Perna, F., Lammers, K., Turrone, S., Gionchetti, P., Brigidi, P. (2009). Immunoregulatory activity of rifaximin associated with a resistant mutant of *Bifidobacterium infantis*. *Int J Antimicrob Agents*, 33:387–389.
- Vivithanaporn, P., Maingat, F., Lin, L.T., Na, H., Richardson, C.D., Agrawal, B., Cohen, E.A., Jhamandas, J.H., Power, C. (2010). Hepatitis C virus core protein induces neuroimmune activation and potentiates human immunodeficiency virus-1 neurotoxicity. *PLoS One*, 5:e12856.
- Vogt, N.M., Kerby, R.L., Dill-Mcfarland, K.A., Harding, S.J., Merluzzi, A.P., Johnson, S.C., Carlsson, C.M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B.B., Rey, F.E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.*, 7(1):13537
- Vyas, U., Ranganathan, N. (2012). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract*, 2012:872716.
- Walker-Caulfield, M.E., Hatfield, J.K., Brown, M.A. (2015). Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 278:112–22.
- Wang, X., Wang, B.R., Zhang, X.J., Xu, Z., Ding, Y.Q., Ju, G. (2002). Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats. *World J. Gastroenterol.*, 8:540–545.

Wang, Y. W., Lin, H. C., Yang, Y. Y., Hou, M. C., Lee, S. D. (2006). Sildenafil decreased pulmonary arterial pressure but may have exacerbated portal hypertension in a patient with cirrhosis and portopulmonary hypertension. *J. Gastroenterol.* 41:593–597

Wannemuehler, M.J., Kiyono, H., Babb, J.L., Michalek, S.M., McGhee, J.R. (1982). Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J Immunol*, 129:959–965.

Watanabe, A. (2000). Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:969–979.

Weber, L. W. D., Boll, M., Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2):105–136.

Weiner, I.D. (2004). The Rh gene family and renal ammonium transport. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 13:533–540.

Weiner, H.L., Da Cunha, A.P., Quintana, F., Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunological reviews*, 241:241–259.

Weissenborn, K., Ennen, J.C., Schomerus, H., Rückert, N., Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.*, 34:768–773.

Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J., Ahl, B. (2005a). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS*, 19 Suppl 3:S93-98.

Weissenborn, K., Giewekemeyer, K., Heidenreich, S., Bokemeyer, M., Berding, G. and Ahl, B. (2005b). Attention, Memory, and Cognitive Function in Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 20:4359–367.

Wigg, A. J. (2001). The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 48(2):206–211.

Wiggs, C.L., Weisberg, J., Martin, A. (1999). Neural correlates of semantic and episodic memory retrieval. *Neuropsychologia*, 37:103-118.

Wiley, N.C., Dinan, T.G., Ross, R.P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J.F. (2017). The microbiota-gut-brain axis as a key regulator of neural function and the stress response: Implications for human and animal health. *J Anim Sci*, 95(7):3225-3246.

Willemsen, L.E., Koetsier, M.A., Van Deventer, S.J., Van Tol, E.A. (2003). Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut*, 52:1442-1447.

Wiltgen, B.J., Royle, G.A., Gray, E.E. (2010). A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One*, 5(9):pii: e12818.

Winters, B.D., Bussey, T.J. (2005). Glutamate Receptors in Perirhinal Cortex Mediate Encoding, Retrieval, and Consolidation of Object Recognition Memory. *Journal of Neuroscience*, 25(17):4243-4251.

Wolfe H, Minogue Am, Rooney S, et al. (2018). Infiltrating macrophages contribute to age-related neuroinflammation in C57/BL6 mice. *Mech Ageing Dev*, 173:84–91.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 203:519–527.

- Xia, M., Sui, Z. (2009). Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin Ther Pat*, 19(3):295-303.
- Xing, C., Li, W., Deng, W., Ning, M., & Lo, E. H. (2018). A potential gliovascular mechanism for microglial activation: differential phenotypic switching of microglia by endothelium versus astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1).
- Xu, D., Gao, J., Gilliland, M., Wu, X., Song, I., Kao, J.Y., Owyang, C. (2014). Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*, 146:484–496.e4.
- Yachha, S.K., Khanduri, A., Sharma, B.C., Kumar, M. (1996). Gastrointestinal bleeding in children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11:903–907.
- Yadav, S.K., Srivastava, A., Srivastava, A., Thomas, M.A., Agarwal, J., Pandey, C.M., Lal, R., Yachha, S.K., Saraswat, V.A., Gupta, R.K. (2010). Encephalopathy assessment in children with extra-hepatic portal vein obstruction with MR, psychometry and critical flicker frequency. *J. Hepatol.* 52:348–354.
- Yamada, K., Hiramatsu, M., Noda, Y., Mamiya, T., Murai, M., Kameyama, T., Komori, Y., Nikai, T., Sugihara, H., Nabeshima, T. (1996). Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience*, 74(2):365-374.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, L., Fan, F., Zhu, L., Li, Z., Ruan, X., Huang, H., Wang, Z., Huang, Z., Huang, Y., Yan, X. Chen, Y. (2010). Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *Journal of hepatology*, 53(2):339–47.
- Yeh, S.-H.H., Chen, P.-J.J. (2010). Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *ONCOLOGY*, 78(1):172–9.
- Yen, C.L., Liaw, Y.F. (1990). Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology*, 37:332–334.
- Yokota, S., Geppert, T.D., Lipsky, P.E. (1988). Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor- α . *Journal of immunology*, 140(2):531–6.
- Yonkers, N.L., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D.D. (2011). Reduced naive CD4 T cell numbers and impaired induction of CD27 in response to T cell receptor stimulation reflect a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases*, 203(5):635–45.
- Yoon, T., Okada, J., Jung, M.W., and Kim, J.J. (2008). Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learn. Mem.*, 15:97–105.
- Yoshida T., Adachi E., Nigi H., Fujii S., And Yanagi M. (1999) Changes of sinusoidal basement membrane collagens in early hepatic fibrosis induced with CCl₄ in cynomolgus monkeys. *Pathology*, 31:29–35.
- Yoshie, O., Imai, T., Nomiya, H. (2001). Chemokines in immunity. *Adv Immunol*, 78:57–110.
- Yu, S., Matsusue, K., Kashireddy, P., Cao, W.Q., Yeldandi, V., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Gonzalez, F.J., Reddy, J.K. (2003). Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) overexpression. *J Biol Chem*, 278(1):498–505.
- Zafar, S., Ishrat Jabeen, I. (2018). Structure, Function, and Modulation of γ -Aminobutyric Acid Transporter 1 (GAT1) in Neurological Disorders: A Pharmacoinformatic Prospective. *Front Chem*, 11:6:397.
- Zafrani, E.S. (2004). Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch.*, 444:3–12.

- Zemtsova, I., Gorg, B., Keitel, V., Bidmon, H.J., Schrör, K., Häussinger, D. (2011). Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology*, 54:204–15.
- Zhang, E.T., Inman, C.B., Weller, R.O. (1990). Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *J Anat.*, 170:111–23.
- Zhang, H., Sparks, J.B., Karyala, S.V., Settlege, R., Luo, X.M. (2015a). Host adaptive immunity alters gut microbiota. *ISME J*, 9(3):770–81.
- Zhang, C.G., Zhang, B., Deng, W.S., Duan, M., Chen, W., Wu, Z.Y. (2016). Role of estrogen receptor β selective agonist in ameliorating portal hypertension in rats with CCl₄-induced liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.*, 22(18):4484–500.
- Zhang, N., Xing, M., Wang, Y., Tao, H., & Cheng, Y. (2015b). Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances spatial learning and synaptic plasticity via the VEGF and BDNF–NMDAR pathways in a rat model of vascular dementia. *Neuroscience*, 311:284–291.
- Zhou, L., Lopes, J., Chong, M., Ivanov, I., Min, R., Victora, G., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y., Rudensky, A., Ziegler, S., Littman, D. (2008). TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*, 453(7192):236–40.
- Zhu, J. and Paul, W.E. (2010). Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological reviews*, 238(1):247–62.
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology*, 28:445–89.